

Die kardiale Phänotypisierung von TASK-1- und Pannexin-1-defizienten Mäusen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr.med.vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Stella Schulte (geb. Petrić)

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

und

Aus der Klinik für Kinderkardiologie und Pneumologie der
Universitätsklinik Düsseldorf

Betreuerin: Prof. Dr. Birgit Donner

Die kardiale Phänotypisierung von TASK-1- und Pannexin-1-defizienten Mäusen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr.med.vet

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Stella Schulte (geb. Petrić)
Tierärztin aus Freiburg

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. Martin Kramer

Gutachter Prof. Dr. Joachim Geyer
 Prof. Dr. Birgit Donner

Tag der Disputation 10.05.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Akutes Herzversagen - häufigste Todesursache weltweit.....	1
1.2	Der plötzliche Herztod	2
1.3	Ionenkanäle am Herzen.....	3
1.4	Das Long-QT-Syndrom (LQTS)	4
1.5	Die Maus als Versuchstier	6
1.5.1	Vergleich der Herzanatomie von Maus und Mensch	7
1.5.2	Vergleich der Elektrokardiogramme (EKGs) von Maus und Mensch	8
1.5.3	Einsatz, Entwicklung und Möglichkeiten von Knock-Out-Mäusen.....	10
1.5.4	Herstellung von Knock-Out-Mäusen	11
1.6	Pannexin-1: Struktur, Expression und Funktion	13
1.6.1	Struktur und Funktion von Pannexinproteinen.....	13
1.6.2	Expression und Funktion von Pannexin-1	15
1.6.3	Kardiale Fuktion von Pannexin-1.....	17
1.6.4	Modulation und Inhibition von Pannexin-1	18
1.6.5	Funktion und Vorkommen von Pannexin-2 und -3	18
1.6.6	Vergleich der Pannexinproteine untereinander und zwischen Maus und Mensch	19
1.6.7	Geplante Untersuchungen an Pannexin-1-defizienten Mäusen	19
1.7	TASK-1: Struktur, Expression und Funktion.....	20
1.7.1	Kaliumkanäle am Herzen.....	20
1.7.2	Expression, Funktion, Hemmung und Aktivierung von TASK-1.....	22
1.7.3	Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu TASK-1-defizienten Mäusen.....	23
1.7.4	Geplante Untersuchungen an TASK-1-defizienten Mäusen.....	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Genotypisierung von Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen	26
2.1.1	DNA-Präparation aus Schwanzspitzen	26
2.1.2	PCR zur Genotypisierung der Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäuse.....	27
2.1.3	PCR zur Genotypisierung der TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäuse	28
2.2	Zucht der Pannexin-1- und TASK-1-Mausstämme	28
2.3	Genehmigungen der Tierversuche	29
2.4	Körperparameter der Pannexin-1 ^{-/-} -und Pannexin-1 ^{+/+} -Mäuse	29

2.5	Histopathologische Untersuchung der Herzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen	30
2.6	Ableitung, Aufzeichnung und Analyse von Oberflächen-EKGs bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosemitteln	31
2.6.1	Isoflurannarkose bei Pannexin-1 ^{+/+} und Pannexin-1-defizienten Mäusen	32
2.6.2	Avertinnarkose [®] (Tribromoethanol) bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen	32
2.6.3	Pentobarbitalnarkose bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	33
2.6.4	Kombinationsnarkose von Ketamin und Xylazin bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	33
2.7	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) am Herzen von Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen	34
2.7.1	Grundlagen	34
2.7.2	Präparation und Katheterimplantation	35
2.7.3	His-Bündel-EKG-Messung	37
2.7.4	Ermittlung der Reizschwelle	39
2.7.5	Vorhofstimulation	39
2.7.6	Kammerstimulation	41
2.7.7	Burststimulation nach Isoprenalininjektion	41
2.7.8	Auswertung der EPU	42
2.8	Telemetrische Untersuchungen an Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	43
2.8.1	Grundlagen	43
2.8.2	Vorbereitungen für die Transmitterimplantation	44
2.8.3	Transmitterimplantation	45
2.8.4	Postoperative Nachsorge	46
2.8.5	Aufzeichnung der Langzeit-EKGs	47
2.8.6	Analyse der Langzeit-EKGs	48
2.8.7	Belastungsuntersuchungen bei Pannexin-1 ^{-/-} und Pannexin-1 ^{+/+} -Mäusen	48
2.8.7.1	Schwimmen	49
2.8.7.2	Laufbandergometrie	49
2.8.7.3	Analyse der Belastungsuntersuchungen	53
2.9	Herzultraschalluntersuchung bei Pannexin-1 ^{-/-} - und Pannexin-1 ^{+/+} -Mäusen	53
2.9.1	Grundlagen	53
2.9.2	Durchführung der Echokardiographie	54
2.9.3	Messwerte	57

2.10	Herzfrequenzturbulenz/ <i>Heart Rate Turbulence (HRT)</i> bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} - Mäusen	58
2.10.1	Grundlagen	58
2.10.2	Präparation und Katheterimplantation	60
2.10.3	Auslösen und Aufnahme von VES.....	61
2.10.4	Analyse	61
2.11	Statistische Auswertungen	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Anthropometrische Daten der Pannexin-1 ^{-/-} - und Pannexin-1 ^{+/+} -Mäuse	63
3.2	Histopathologische Untersuchung der Herzen von Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	64
3.3	Oberflächen-EKGs bei Pannexin-1- und TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosen	65
3.3.1	Isoflurannarkose bei Pannexin-1 ^{+/+} -und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	65
3.3.2	Isoflurannarkose bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	66
3.3.3	Avertin®-Narkose bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	67
3.3.4	Avertin®-Narkose bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	67
3.3.5	Pentobarbitalnarkose bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	69
3.3.6	Telemetrisch abgeleitete EKGs bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	70
3.3.7	Telemetrisch abgeleitete EKGs bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	70
3.3.8	Vergleich der Herzfrequenzen unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier ..	71
3.3.8.1	Herzfrequenzen bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen.....	71
3.3.8.2	Herzfrequenzen bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	72
3.3.9	Vergleich des QT-Intervalls unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier	73
3.3.9.1	QT-Intervalle bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} - Mäusen	73
3.3.9.2	QT-Intervalle bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	75
3.3.10	Vergleich des QTc-Intervalls unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier	76
3.3.10.1	QTc-Intervalle bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen.....	76
3.3.10.2	QTc-Intervalle bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	79
3.3.11	EKG-Veränderungen nach Isoprenalinstimulation unter Avertin®-Narkose	83
3.3.11.1	Veränderungen bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	83
3.3.11.2	Veränderungen bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	85
3.4	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) am Mäuseherzen	87
3.4.1	AV-Messung bei Pannexin-1- und TASK-1- WT- und KO-Mäusen	87
3.4.2	Ermittlung der Reizschwelle	87

3.4.3	Stimulation nach Protokoll (siehe Anhang).....	87
3.4.4	Ergebnisse der EPU bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	88
3.4.5	Ergebnisse der EPU bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	88
3.4.6	Atriale und ventrikuläre Burststimulation.....	89
3.4.7	Ergebnisse der Burststimulation bei Pannexin-1 ^{+/+} -und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	89
3.4.8	Ergebnisse der Burststimulation bei TASK-1 ^{+/+} -und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	93
3.5	Telemetrische EKG-Ableitungen bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen.....	94
3.5.1	Auffälligkeiten im 24-Stunden-EKG	94
3.5.2	Schwimmversuche.....	96
3.5.2.1	Herzfrequenzen vor, während und nach dem Schwimmen.....	96
3.5.2.2	Rhythmusstörungen während des Schwimmens	96
3.5.3	Laufbandversuch I ohne Steigung	97
3.5.3.1	Herzfrequenzen vor, während und nach dem Laufen.....	97
3.5.3.2	Rhythmusstörungen während des Laufens auf dem Laufband ohne Steigung	98
3.5.4	Laufbandergometrie II mit Steigung.....	98
3.5.4.1	Herzfrequenzen vor, während und nach dem Laufband II mit Steigung	99
3.5.4.2	Rhythmusstörungen während des Laufens auf dem Laufband mit Steigung	99
3.5.5	Vergleich der Ergebnisse beider Laufbandprotokolle	99
3.5.5.1	Vergleich der mittleren Herzfrequenzen vor, während und nach allen Belastungsuntersuchungen	100
3.5.5.2	Vergleich maximaler Herzfrequenzen während körperlicher Belastung	101
3.5.5.3	Vergleich der Herzfrequenzen von Pannexin-1 ^{+/+} und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen in der Erholungsphase	102
3.6	Echokardiographie bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen.....	103
3.7	Herzfrequenz-turbulenz (HRT) bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	105
3.7.1	Vergleich des Turbulence Onset (TO) beider TASK-1-Genotypen.....	105
3.7.2	Vergleich des Turbulence Slope (TS) beider TASK-1-Genotypen	106
4	Diskussion	107
4.1	Diskussion der Untersuchungsergebnisse von Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	107
4.1.1	Anthropometrische Daten der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse.....	107
4.1.2	Histopathologische Untersuchungen an Herzen von Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	108
4.1.3	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	108

4.1.3.1	Vergleichende Quantifizierung von AV-Blöcken	108
4.1.3.2	Atriale Tachyarrhythmien bei Pannexin-1-defizienten Mäusen	109
4.1.4	Echokardiographie bei Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	112
4.2	Diskussion der Untersuchungsergebnisse von TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	113
4.2.1	Heart Rate Turbulence bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen.....	113
4.2.2	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen ...	114
4.3	Diskussion der Untersuchungsergebnisse von EKG-Aufzeichnungen bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen.....	116
4.3.1	Herzfrequenzen unter verschiedenen Narkosen und bei wachen Mäusen.....	116
4.3.2	Herzfrequenzen von Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen während verschiedener Belastungsuntersuchungen	118
4.3.3	QT- und frequenzkorrigierte QTc-Intervalle bei wachen Mäusen und unter verschiedenen Narkosen	119
4.3.4	Veränderungen der QT- und QTc-Intervalle von TASK-1 und Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen nach Isoprenalinstimulation	120
4.3.5	Übrige EKG-Parameter von wachen Pannexin-1 ^{+/+} - und Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen und unter verschiedenen Narkosen	121
4.3.6	Übrige EKG-Parameter von TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen unter verschiedenen Narkosen	121
4.4	Fazit unserer Untersuchungen an Pannexin-1-defizienten Mäusen.....	122
4.5	Fazit unserer Untersuchungen an TASK-1-defizienten Mäusen.....	123
4.6	Schlussfolgerung.....	123
5	Abkürzungsverzeichnis	124
6	Zusammenfassung	128
7	Summary.....	130
8	Literaturverzeichnis.....	132
9	Publikationen	155
10	Erklärung.....	156
11	Danksagung.....	157
12	Anhang.....	159

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aktionspotenzial und Ionenströme einer Zelle der Vorhofmuskulatur.....	3
Abbildung 1.2: Diagnosekriterien für das LQTS.....	5
Abbildung 1.3: Zwei unserer Versuchstiere „nach getaner Arbeit“	6
Abbildung 1.4: Die Titelseite der <i>Nature</i> von Dezember 2002	7
Abbildung 1.5: EKG von Mensch (A) und Maus (B) schematisch dargestellt	8
Abbildung 1.6: Manuelle Festlegung des T-Wellen-Endes bei der Maus.....	9
Abbildung 1.7: Herstellung von Knock-Out-Mäusen.....	11
Abbildung 1.8: Vergleich der Strukturen von Connexin und Pannexin	13
Abbildung 1.9: Strukturvergleich der drei verschiedenen Pannexingene der Maus	15
Abbildung 1.10: Die hypothetische Aufgabe von Pannexin Hemichannels bei der Übertragung von Calciumsignalen.....	17
Abbildung 1.11: Molekularer Aufbau der K_{2P} -Kanäle	22
Abbildung 2.1: Prinzip der DNA-Präparation; modifiziert nach dem Handbuch des DNeasy® Blood and Tissue Kit.....	26
Abbildung 2.2: Elektrophysiologiekatheter für Mensch und Maus	34
Abbildung 2.3: Größenverhältnis des Katheters zu einer Eurocentmünze	35
Abbildung 2.4: Blick durchs Mikroskop während der OP	36
Abbildung 2.5: Die freipräparierte und abgebundene Vena jugularis vor dem Einführen des Oktapolar-katheters	37
Abbildung 2.6: His-Bündel-Messung bei einer Pannexin-1 ^{+/+} -Maus.	38
Abbildung 2.7: Versuchsaufbau bei der EPU.....	39
Abbildung 2.8: Unsere Telemetrietransmitter	43
Abbildung 2.9: Maus auf dem OP-Tisch	44
Abbildung 2.10: Frisch operierte Maus	46
Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Langzeit-EKG-Aufzeichnung	47
Abbildung 2.12: Maus beim Schwimmen mit manueller Unterstützung.....	49
Abbildung 2.13: Das Laufband in gerader Position	50
Abbildung 2.14: Eine Maus auf dem geraden Laufband	52
Abbildung 2.15: Das von uns genutzte Ultraschallgerät	54
Abbildung 2.16: Maus während der Echokardiographie.....	55
Abbildung 2.17: Messung der diastolischen Herzlänge und des inneren Herzumfanges in der parasternalen langen Achse	56
Abbildung 2.18: Kurze Achse im B-Mode (linker Ventrikel).....	56
Abbildung 2.19: Messung der Wanddicken (jeweils in der Diastole und in der Systole) in der kurzen Achse im M-Mode	57
Abbildung 2.20: Physiologische HRT nach einer ventrikulären Extrasystole	60
Abbildung 3.1: Beispiele für Isofluran-EKGs bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen.....	66
Abbildung 3.2: Beispiele für Avertin®-EKGs bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	68
Abbildung 3.3: Beispiele für Pentobarbital-EKGs bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	69

Abbildung 3.4: Beispiele für telemetrisch abgeleitete EKGs bei TASK-1 ^{+/+} - und TASK-1 ^{-/-} -Mäusen	71
Abbildung 3.5 Herzfrequenzen der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse im Vergleich.....	72
Abbildung 3.6: Herzfrequenzen der TASK-1 WT- und KO-Mäuse im Vergleich	73
Abbildung 3.7: QT-Intervalle der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®, Isofluran und ohne Narkose	74
Abbildung 3.8: Vergleich der telemetrisch ermittelten QT-Zeiten von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen	74
Abbildung 3.9: Vergleich der QT-Intervalle von TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosen	75
Abbildung 3.10: Vergleich der telemetrisch ermittelten QT-Zeiten von TASK-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen	76
Abbildung 3.11: Vergleich der QTc-Intervalle bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen unter Avertin®, Isofluran und bei wachen Tieren.....	77
Abbildung 3.12: Vergleich der telemetrisch ermittelten QTc-Zeiten von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen	77
Abbildung 3.13: Vergleich der nach Mitchell und Framingham frequenzkorrigierten QTc-Zeiten beider Pannexin-1-Genotypen.....	78
Abbildung 3.14: Verhältnis der QTc/QT-Quotienten beider Pannexin-1-Genotypen zu den jeweiligen RR-Intervallen.....	79
Abbildung 3.15: Vergleich der QTc-Intervalle unter verschiedenen Narkosen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen	80
Abbildung 3.16: Vergleich der telemetrisch ermittelten QTc-Zeiten von TASK-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen	81
Abbildung 3.17: Vergleich der nach Mitchell und Framingham frequenzkorrigierten QTc-Zeiten der TASK-1 WT- und KO-Mäuse	82
Abbildung 3.18: Verhältnis der QTc/QT-Quotienten beider TASK-1-Genotypen zu den jeweiligen RR-Intervallen	82
Abbildung 3.19: Vergleich der QT- und QTc-Intervalle von TASK-1 WT- und KO-Mäusen vor und nach Isoprenalin	86
Abbildung 3.20: Beispiel für eine AV-Dissoziation bei einer Pannexin-1-defizienten Maus.....	90
Abbildung 3.21: Beispiel für eine ventrikuläre Tachykardie einer Pannexin-1-defizienten Maus	90
Abbildung 3.22: Beispiel für eine atriale Tachykardie bei einer Pannexin-1-defizienten Maus nach einem atrialen Burst bei 10ms	90
Abbildung 3.23: Atriale Tachyarrhythmie nach einem atrialen Burst mit 30ms bei einer Pannexin-1-defizienten Maus.....	91
Abbildung 3.24: Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien nach verschiedenen Bursts bei Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen	92
Abbildung 3.25: Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien bei Pannexin-1 ^{-/-} -Mäusen nach Bursts verschiedener Stimulationsfrequenzen	92
Abbildung 3.26: Beispiel für einen AV-Block II direkt im Anschluss an eine Burststimulation	95
Abbildung 3.27: Vergleichende Darstellung der TO-Werte bei TASK-1 WT- und KO- Mäusen.....	106

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zeitliche Einteilung des Schwimmversuches</i>	49
<i>Tabelle 2: Laufbandprotokoll I ohne Steigung.....</i>	51
<i>Tabelle 3: Laufbandprotokoll II mit Steigung</i>	51
<i>Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf beider Laufbandversuche.....</i>	52
<i>Tabelle 5: Anthropometrische Daten der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse</i>	63
<i>Tabelle 6: Vergleichende Histopathologie an Herzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen</i>	64
<i>Tabelle 7: EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Isoflurannarkose</i>	65
<i>Tabelle 8: EKG-Werte der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Isoflurannarkose</i>	66
<i>Tabelle 9: EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®-Narkose</i>	67
<i>Tabelle 10: EKG-Intervalle der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®-Narkose.....</i>	68
<i>Tabelle 11: EKG-Intervalle der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Pentobarbitalnarkose</i>	69
<i>Tabelle 12: Telemetrisch abgeleitete EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse</i>	70
<i>Tabelle 13: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der Pannexin-1^{+/+}-Mäuse vor und nach Isoprenalin ...</i>	83
<i>Tabelle 14: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der Pannexin-1^{-/-}-Mäuse vor und nach Isoprenalin.....</i>	83
<i>Tabelle 15: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider Pannexin-1-Genotypen vor Isoprenalin</i>	84
<i>Tabelle 16: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider Pannexin-1-Genotypen nach Isoprenalin</i>	84
<i>Tabelle 17: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der TASK-1^{+/+}-Mäuse vor und nach Isoprenalin</i>	85
<i>Tabelle 18: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der TASK-1^{-/-}-Mäuse vor und nach Isoprenalin</i>	85
<i>Tabelle 19: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider TASK-1-Genotypen vor Isoprenalin</i>	86
<i>Tabelle 20: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider TASK-1-Genotypen nach Isoprenalin</i>	86
<i>Tabelle 21: Bei der EPU ermittelte Werte von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen</i>	88
<i>Tabelle 22: Bei der EPU ermittelte Werte von TASK-1 WT- und KO-Mäusen</i>	89
<i>Tabelle 23: Vorkommen von AV-Dissoziationen und atrialen Tachyarrhythmien bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen.....</i>	91
<i>Tabelle 24: Rhythmusstörungen nach Burststimulationen bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen</i>	93
<i>Tabelle 25: Rhythmusstörungen nach Burststimulationen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen</i>	93
<i>Tabelle 26: Auftreten von AV-Dissoziationen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen.....</i>	94
<i>Tabelle 27: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen</i>	95
<i>Tabelle 28: AV-Blöcke bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen im 24-Stunden-EKG.....</i>	95
<i>Tabelle 29: Durchschnittliches Auftreten von VES bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen im Langzeit-EKG.....</i>	96
<i>Tabelle 30: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Schwimmens</i>	96

<i>Tabelle 31: Ergebnisse des Laufbandversuches I bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabelle 32: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Laufbandversuches ohne Steigung</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 33: Ergebnisse des Laufbandversuches II bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 34: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Laufbandversuches mit Steigung</i>	<i>99</i>
<i>Tabelle 35: Vergleich beider Laufbandversuche bezüglich gelaufener Distanz und Endgeschwindigkeit</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 36: Durchschnittliche Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen vor dem Schwimmen und der Laufbandergometrie</i>	<i>100</i>
<i>Tabelle 37: Durchschnittliche Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen während des Schwimmens und der Laufbandergometrie</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 38: Maximal erreichte Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen während des Schwimmens und der Laufbandergometrie</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 39: Maximal erreichte Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen bei allen Belastungsformen.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabelle 40: Mittlere Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen in der Erholungsphase aller Belastungsformen.....</i>	<i>102</i>
<i>Tabelle 41: Überblick über die Herzfrequenzentwicklung vor und nach körperlicher Betätigung bei beiden Pannexin-1-Genotypen</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 42: Echokardiographisch ermittelte Messwerte von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 43: Mittelwerte des TO beider TASK-1-Genotypen bei allen Vorzeitigkeiten</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 44: Auftreten des positivsten TS bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 45: Vergleich der TS-Werte bei TASK-1-Mäusen</i>	<i>106</i>

1 Einleitung

1.1 Akutes Herzversagen - häufigste Todesursache weltweit

*„Mitten im Unterricht: Mathe-Lehrer fiel plötzlich tot um“
(Berliner Kurier, März 2000).*

Als Todesursache wurde in der Pathologie ein Herzinfarkt diagnostiziert.

Solche und ähnliche- zugegebenermaßen nicht wissenschaftlich fundierte- Schlagzeilen begegnen uns häufig. Vermeintlich gesunde Menschen sterben plötzlich, meist ohne jegliche vorangehende Symptome. Die Diagnose der Pathologen lautet nach der Obduktion in solchen Fällen häufig **Tod durch akutes Herzversagen oder akuten Myokardinfarkt**. Eine genaue Diagnose ist nach einem plötzlichen Herztod oft nicht möglich, da bei einer Obduktion häufig keine pathologischen Veränderungen am Herzen vorgefunden werden können.

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems waren wie in den Vorjahren auch im Jahre 2013 mit knapp 40% aller Todesfälle die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2014).

Davon starben die meisten Menschen an ischämischen Herzkrankheiten (36%), gefolgt von sonstigen Formen der Herzerkrankungen (27%), zerebrovaskulären Krankheiten (17%), akutem Myokardinfarkt (15%) und Hypertonie (11%). Etwas weniger häufig waren Schlaganfälle, Krankheiten der Arterien und rezidivierende Myokardinfarkte (Statistisches Bundesamt, 2014).

Die Statistik der World Health Organization (WHO) zeigt ein ähnliches Bild: 30% der Menschen, die weltweit 2012 starben, unterlagen einem Herz-Kreislauf-Leiden (WHO, 2013).

Der Anteil der in Deutschland am akuten Herzinfarkt Gestorbenen ist von 2000 bis 2010 kontinuierlich um etwa 20% gesunken (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V, 2011 und 2014), was an den ständig verbesserten Diagnose- und

Behandlungsmöglichkeiten von Herzerkrankungen liegt und das Resultat des immensen Forschungsaufwandes darstellt.

1.2 Der plötzliche Herztod

Laut Definition handelt es sich beim plötzlichen Herztod um einen „herzbedingten Tod, der sich mit einem plötzlichen Bewusstseinsverlust innerhalb der ersten Stunde seit Beginn der akuten Symptome ankündigt. Eine Herzerkrankung kann vorher bestanden haben, aber sowohl der Todeszeitpunkt, als auch seine Art sind unerwartet“ (Myerburg und Castellanos, 1997; Priori et al., 2001).

Die Inzidenz für einen plötzlichen Herztod bei Personen vor Vollendung des 40. Lebensjahres liegt in BRD und Nordamerika jedes Jahr bei etwa 3 pro 100.000. Bei einem erheblichen Anteil der Verstorbenen gibt es dafür eine hereditäre Ursache (Beckmann et al., 2011) wie primär strukturelle Herzerkrankungen mit erhöhtem Arrhythmierisiko, hypertrophe (obstruktive) Kardiomyopathien, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie- oder -Dysplasien, dilatative Kardiomyopathien und Non-Compaction-Kardiomyopathien (Beckmann et al., 2011). Strukturelle Herzerkrankungen wie Klappendefekte und angeborene Herzanomalien, aber auch chronische Herzinsuffizienzen werden in der Regel aufgrund der klinischen Symptome schon früh vom Kardiologen diagnostiziert und dementsprechend behandelt. Trotzdem können aber auch sie ursächlich für einen plötzlichen Herztod sein. Auch ein Myokardinfarkt kann –wenn nicht rechtzeitig erkannt- zum plötzlichen Herztod führen.

Gegenstand aktueller Forschung sind genetisch bedingte Arrhythmien bei strukturell unauffälligem Herzen. Diese folgen meist einem autosomal-dominanten Erbgang und betreffen häufig ansonsten junge, gesunde Menschen. Bei rechtzeitiger Erkennung eines Betroffenen sind sie überwiegend gut behandelbar (Beckmann et al., 2011) - allerdings nicht heilbar. Genetisch bedingten Arrhythmien liegen meist Fehlfunktionen von Ionenkanälen des Herzmuskels zugrunde. Ihre Erkennung kann das Risiko eines plötzlichen Herztodes erheblich senken (Beckmann et al., 2011).

1.3 Ionenkanäle am Herzen

Ionenkanäle sind große membranständige Proteinkomplexe, die selektive zentrale Poren für Natrium-, Kalium-, Chlorid- oder Calciumionen bilden (Lerche et al., 2000a; Delisle et al., 2004) und so die Grundlage der elektrischen Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen darstellen. Über die Umwandlung von Sinnesreizen in Rezeptorpotenziale vermitteln sie die Kommunikation mit der Umwelt und leiten Nachrichten über Aktionspotenziale und synaptische Übertragungsvorgänge von Zelle zu Zelle weiter (Lerche et al., 2000a). Die Aktionspotenziale am Herzen spiegeln Veränderungen in der Membranleitfähigkeit wider, die von dutzenden verschiedenen Ionenkanälen und Elektronenaustauschern geleitet werden (Delisle et al., 2004). Ein ventrikuläres Aktionspotenzial gliedert sich analog zu Abbildung 1.1 in fünf Abschnitte (Mischke und Stellbrink, 2005):

Phase 0: Ein schneller intrazellulärer Natriumeinstrom führt zur **Depolarisation**

Phase 1: Der transiente extrazellulär gerichtete Kaliumausstrom leitet die **Repolarisation** ein

Phase 2: Calciumeinwärts- und verzögerte Kaliumauswärtsströme erhalten das **Aktionspotenzialplateau**

Phase 3: Der Kaliumauswärtsstrom dominiert den Calciumeinwärtsstrom und führt so zur **Repolarisation**

Phase 4: Das Kaliumgleichgewichtspotenzial wird erreicht und bildet das diastolische **Ruhepotential**

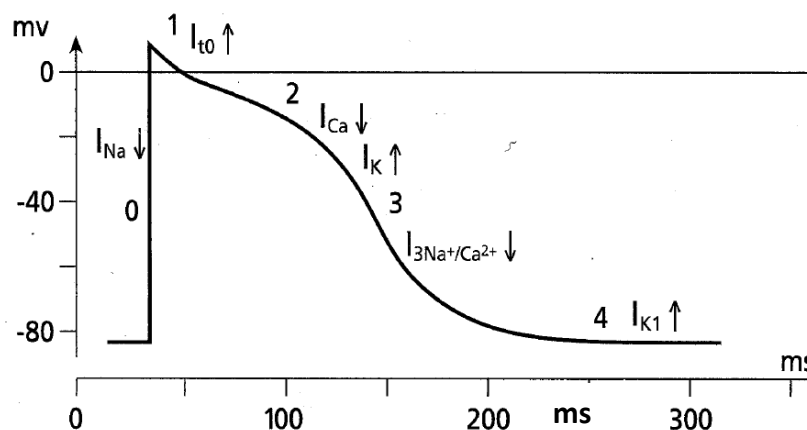


Abbildung 1.1: Aktionspotenzial und Ionenströme einer Zelle der Vorhofsmuskulatur
Modifiziert nach von Engelhardt und Breves, 2005

Die durch eine Mutation hervorgerufene Störung eines Ionenkanalgens kann lange Zeit durch gegenregulatorische Mechanismen kompensiert werden. Unter bestimmten Umständen aber beeinflusst das veränderte Schaltverhalten der membranständigen Kanalproteine die Erregbarkeit des betroffenen Gewebes (Lerche et al., 2000a). So bewirkt beispielsweise die Verlängerung der Plateauphase auch eine Verlängerung des QT-Intervalls. Verfrühte kleine Nachschwankungen können in dieser Phase - vorausgesetzt sie sind ausreichend hoch – Aktionspotenziale, Torsades de Pointes und andere Herzarrhythmien auslösen (Mischke und Stellbrink, 2005).

Zu den häufigsten kardialen Ionenkanalerkrankungen gehören das Long QT-Syndrom (LQTS) die katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT), das Brugada-Syndrom (BrS) und das Short-QT-Syndrom (SQTS). Erkrankungen können sich in jedem Alter manifestieren (Beckmann et al., 2011). Bis heute wurden bereits viele Ionenkanalfamilien mitsamt ihrer Transportproteine, zugehöriger Kanäle und der für sie codierenden Gene identifiziert (Delisle et al., 2004), wodurch exaktere Diagnosen möglich sind (Lerche et al., 2000b). Das Forschungsziel wird sicherlich in den nächsten Jahren das gleiche bleiben: Es gilt die Mechanismen zu verstehen und zu behandeln, um die Lebensqualität Betroffener zu verbessern und Leben zu erhalten (Delisle et al., 2004).

1.4 Das Long-QT-Syndrom (LQTS)

Das Long-QT-Syndrom (LQTS) wurde erstmals im Jahre 1957 von Jervell und Lange-Nielsen ausführlich beschrieben. Mittlerweile gibt es mehr als 16 verschiedene Unterformen (Schwartz et al., 2013), Tendenz steigend, die alle aufgrund einer gestörten Repolarisation der Herzmuskelfasern zu einer Verlängerung des QT-Intervalls führen (Delisle et al., 2004; Mischke und Stellbrink, 2005). Meist – bei LQTS 1,2,5,6,7- sind Dysfunktionen von Kaliumkanälen, oder deren Untereinheiten (Mischke und Stellbrink, 2005) die Ursache. Dadurch wird der Kaliumstrom vermindert und die Repolarisation gehemmt, mit der Folge einer Übererregbarkeit der Kardiomyozyten (Delisle et al., 2004). Es können ventrikuläre Tachyarrhythmien auftreten, die in einigen Fällen zu Synkopen oder sogar zum plötzlichen Herztod führen (Delisle et al., 2004). Dies betrifft in der Regel

junge, ansonsten gesunde Menschen (Delisle et al., 2004; Beckmann et al., 2011). Neben dem kongenitalen LQTS können auch verschiedene Medikamente (siehe www.qtdrugs.org) und Elektrolytverschiebungen wie eine Hypokaliämie zu einer QT-Verlängerung, also einem erworbenen LQTS, führen (Mischke und Stellbrink, 2005).

Im EKG von Patienten mit einem LQTS können QT-Zeit-Verlängerungen unterschiedlicher Ausprägung, T-Wellen-Kerbungen oder, als ein Warnsignal für Tachykardien, ein T-Wellen alternans nachgewiesen werden. Typisch sind sogenannte Torsades-de-Pointes-Tachykardien, die durch spindelförmig undulierende QRS-Komplexe charakterisiert werden (Beckmann et al., 2011). Bei der Diagnosestellung spielt neben der Auswertung von Ruhe-, Belastungs- und Langzeit-EKGs, sowie der Echokardiographie auch eine ausführliche Familienanamnese (Mischke und Stellbrink, 2005) und ein Gentest eine Rolle (Beckmann et al., 2011). Trotzdem kann auch ein positives Testergebnis nie vorhersagen, ob ein Patient überhaupt Symptome entwickeln, oder wie die Krankheit verlaufen wird.

Weil die Diagnose bei Grenzfällen schwierig ist und verschiedene Parameter einfließen müssen, haben Schwartz et al. 2012 Kriterien ermittelt (siehe Abb.1.2), die diejenige Patienten identifizieren sollen, bei denen es sinnvoll ist, einen Gentest durchzuführen. Demnach sollte jeder Patient, der in Tabelle 1.2 mindestens 3 Punkte erreicht, genetisch untersucht werden.

Befunde im EKG			Punkte
A	QTc (ms)	≥ 480	3
		460-479	2
		450-459	1
B	QTc ≥ 480 ms in der 4. Minute nach dem Stresstest		1
C	Torsades de pointes		2
D	T-wave alternans		1
E	Einkerbung der T-Welle		1
F	Niedrige Herzfrequenz fürs Alter		0,5
Krankengeschichte			
A	Synkope	mit Stress	2
		ohne Stress	1
B	Angeborene Taubheit		0,5
Familiengeschichte			
A	Familienmitglieder mit LQTS 2 nahen		1
B	Angehörigen unter 30 Jahren		0,5

QTc nach Bazett berechnet

≤1 Punkt:
geringe Wahrscheinlichkeit von LQTS

1,5-3 Punkte:
Mittlere Wahrscheinlichkeit von LQTS

≥3,5:
Hohe Wahrscheinlichkeit von LQTS

Abbildung 1.2: Diagnosekriterien für
modifiziert nach Schwartz et al., 2012

Abbildung 1.2: Diagnosekriterien für das LQTS
modifiziert nach Schwartz et al., 2012

Sind die Patienten symptomatisch, gibt es verschiedene Trigger, die besonders häufig Synkopen und einen plötzlichen Herztod auslösen: Während beim LQTS1 körperliche Belastung wie Schwimmen gefährlich ist, spielen beim LQTS2 emotionaler Stress und akustische Stimuli eine große Rolle. Auslöser für das LQTS3 dagegen sind Ruhe und Schlaf (Mischke und Stellbrink, 2005; Beckmann et al., 2011). Neben diesen möglichen Auslösern müssen auch QT-Zeit-verlängernde Medikamente vermieden werden (Beckmann et al., 2011). Therapeutisch haben sich Beta-Blocker als Mittel der Wahl (Mischke und Stellbrink, 2005; Lerche et al., 2000b; Beckmann et al., 2011) erwiesen; manche Fälle machen allerdings eine linksseitige sympathische kardiale Denervation oder die Implantation eines Defibrillators (Beckmann et al., 2011; Mischke und Stellbrink, 2005; Lerche et al., 2000b) nötig.

1.5 Die Maus als Versuchstier

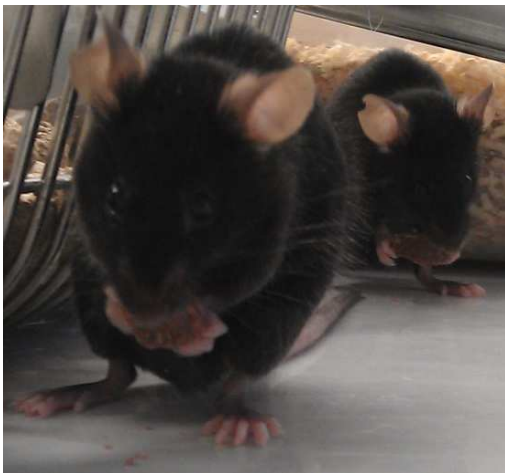


Abbildung 1.3: Zwei unserer Versuchstiere „nach getaner Arbeit“

Die Maus ist seit Jahren das am häufigsten verwendete Versuchstier; so waren beispielsweise im Jahr 2013 in Deutschland 73% aller eingesetzten Versuchstiere Mäuse, 41% davon transgene (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2013). Diese Zahlen sind sicherlich darauf zurückzuführen, dass Mäuse nicht viel Platz und Pflege brauchen, sich problemlos und vor allen Dingen schnell fortpflanzen, unkompliziert sind was die Fütterung betrifft und nur wenige Kosten verursachen (Doevendans et al., 1998). Außerdem sind bisher bei keiner anderen Tierart gezielte Genmanipulationen in dem Ausmaße möglich, wie bei Mäusen.

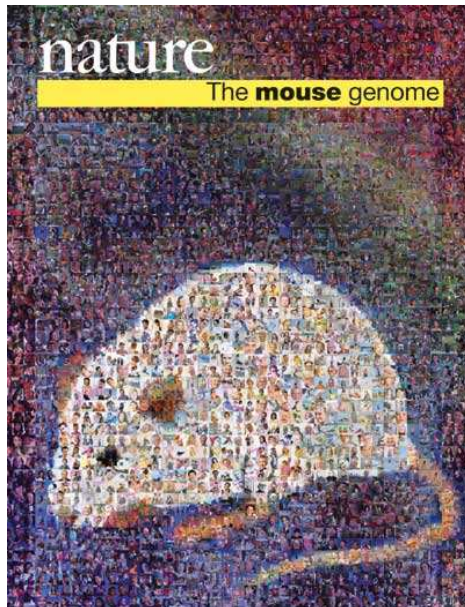


Abbildung 1.4: Die Titelseite der *Nature* von Dezember 2002

Das Mäusegenom ist bereits seit 2002 komplett entziffert und in der Zeitschrift *Nature* publiziert (Waterston et al., 2002), sodass zu transgenen Tieren führende Mutationen zumindest theoretisch fast nach Belieben vorgenommen werden können.

1.5.1 Vergleich der Herzanatomie von Maus und Mensch

Auch wenn die Maus mit 1-2 Jahren eine wesentlich geringere Lebenserwartung hat als der Mensch und sich auch äußerlich vollkommen von uns differenziert, arbeiten ihre Organe doch sehr ähnlich wie unsere und unterscheiden sich im Aufbau nur gering.

Die Größe des Herzens steigt proportional zur Körpergröße der Säugetiere an und unterscheidet sich kaum zwischen verschiedenen Spezies (Kusunose et al., 2012 und Doevendans et al., 1998). So ähneln sich die Ventrikelstrukturen des Mäuse- und Menschenherzens sehr, allerdings unterscheidet sich im Gegensatz zum Menschen bei der Maus das apikale Trabekelsystem zwischen beiden Ventrikeln nicht. Die größten Unterschiede zwischen Mensch und Maus beschränken sich beim Herzaufbau auf die Vorhofebene und das venöse Abflusssystem: So persistiert im Mäuseherzen die linke Vena cava superior und mündet in den rechten Vorhof. Außerdem haben die Pulmonalvenen der Maus im Gegensatz zu den menschlichen alle eine gemeinsame Öffnung in den linken Vorhof. Darüber hinaus gibt es bei Letzterer nur ein rudimentäres Vorhofseptum (Webb et al., 1996) und kein stabiles, wie im menschlichen Herz.

Auch das Leitungssystem der Maus unterscheidet sich von dem des Menschen: So liegt der Sinusknoten nicht wie beim Menschen im Vorhof, sondern in der Vena cava superior, und zwar direkt über ihrer Einmündung in den rechten Vorhof. Die Größe des AV-Knotens steigt in nicht proportionalen Verhältnissen mit der Herzgröße an (Meijler, 1985).

Die Coronararterienanatomie der Mäuse mit einer frühen Abzweigung der großen septalen Coronararterie aus dem linken Coronarsystem, die auch bei Hamstern und Hasen gefunden wird, ist vergleichbar mit anderen Säugetieren (Doevendans et al., 1998). Auch die Ejektionsfraktion ist bei allen Spezies gleich (Liu et al., 2012).

1.5.2 Vergleich der Elektrokardiogramme (EKGs) von Maus und Mensch

Erste EKG-Aufzeichnungen bei Mäusen wurden zwar bereits 1929 veröffentlicht (Agduhr und Stenstrom), aber erst seit etwa 50 Jahren weiß man über die Schwierigkeit, das QT-Segment bei der Maus genau zu definieren (Wehrens et al., 2000).

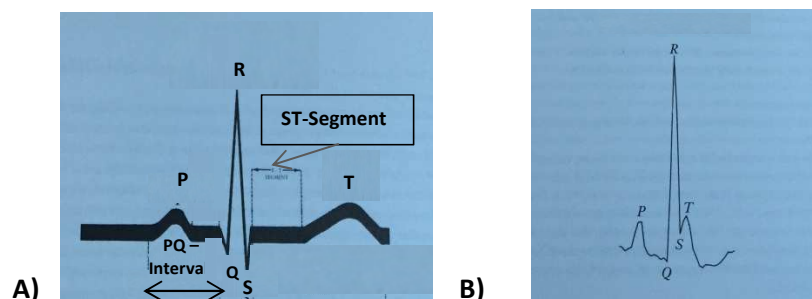


Abbildung 1.5: EKG von Mensch (A) und Maus (B) schematisch dargestellt
Modifiziert nach Kramer, 2000

Anders als beim Menschen verschmilzt die T-Welle der Maus mit dem Ende des QRS-Komplexes, sodass hier keine ST-Intervalle erkannt werden können.

Die EKG-Intervalle der Maus sind aufgrund ihrer hohen Herzfrequenzen deutlich kürzer, als beim Menschen. Im Gegensatz zu ihm können bei der Maus keine ST-Intervalle erkannt werden, weil die eigentliche T-Welle mit dem Ende des QRS-Komplexes verschmilzt (Doevendans et al., 1998; Mitchell et al., 1998). Als Ende der biphasischen T-Welle der Maus, also als Repolarisationsende, wird der Punkt bezeichnet, an dem die T-

Welle die isoelektrische Linie schneidet (Mitchell et al., 1998; Chaves et al., 2003; Swynghedauw und Aubert, 2003; siehe Abbildung 1.6).

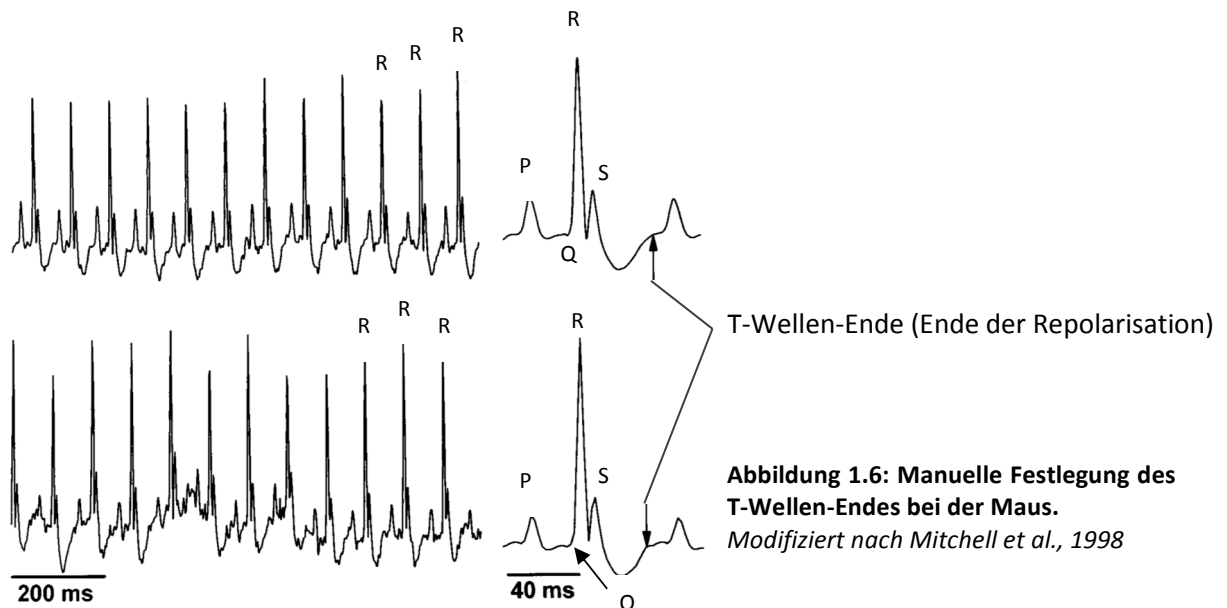


Abbildung 1.6: Manuelle Festlegung des T-Wellen-Endes bei der Maus.
Modifiziert nach Mitchell et al., 1998

Der Schnittpunkt von T-Welle und isoelektrischer Linie wird als Repolarisationsende definiert.

Die physiologische Ruheherzfrequenz der Maus liegt mit etwa 550-620 Schlägen in der Minute (min^{-1} ; Takuma et al., 2001; Kass et al., 1998) deutlich höher als bei uns Menschen mit durchschnittlich 70 Schlägen pro Minute (Doevendans et al., 1998; Silbernagel und Despopoulos, 2003). PR-, RR-, QRS- und QT-Intervalle sind bei Mäusen entsprechend kürzer.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Aktionspotentiale und der anatomische Herzaufbau, sowie die Ionenkanalexpression beider Spezies zwar marginal voneinander unterscheiden, eine Übertragung der Forschungsergebnisse von der Maus auf den Menschen im Wesentlichen aber trotzdem zulassen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist es sicherlich das Beste aller möglichen Systeme zur Grundlagenforschung am Herzen.

1.5.3 Einsatz, Entwicklung und Möglichkeiten von Knock-Out-Mäusen

Die Vorarbeiten zur Entwicklung von Knock-Out-Mäusen brachten dem Amerikaner Mario Capecchi und seinen beiden britischen Forscherkollegen Sir Martin Evans und Oliver Smithies 2007 den Nobelpreis für Medizin ein. Knock-Out-Mäuse sind bisher die einzigen im Labor mit transgenen Techniken erzeugten Lebewesen, bei denen erfolgreich und gezielt ein oder mehrere Gene ausgeschaltet wurden. Diese verlieren ihre Funktion und ermöglichen Forschern so, Rückschlüsse auf ihre Rolle bei (erblichen) Krankheiten zu schließen. Mit unseren beiden Zuchtlinien, den Pannexin-1- und TASK-1-Mäusen, stehen uns solche Knock-Out-Mäuse für Versuche zur Verfügung. Trotzdem bleibt immer die abschließende Frage der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen.

1.5.4 Herstellung von Knock-Out-Mäusen

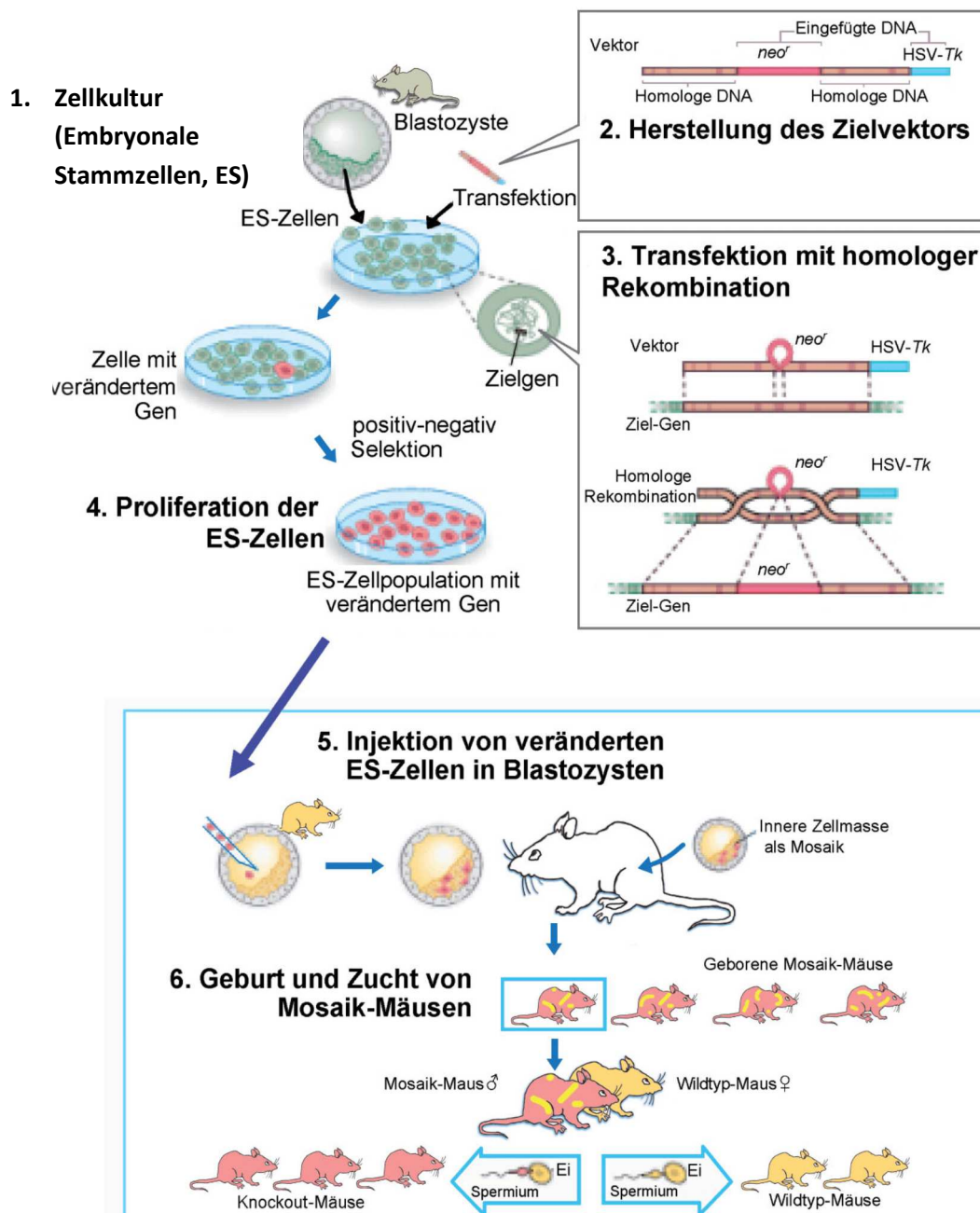


Abbildung 1.7: Herstellung von Knock-Out-Mäusen

Modifiziert nach Graw, 2007

Ein Zielvektor wird durch Transfektion in eine Zellkultur embryonaler Stammzellen gebracht und mittels homologer Rekombination in die DNA der Stammzellen eingebaut. Durch Proliferation der veränderten Zellen entsteht schließlich eine Zellpopulation mit verändertem Gen, die in Mäuseblastozysten injiziert wird.

Diese Blastozysten werden weiblichen Mäusen per Embryotransfer eingesetzt und von ihnen ausgetragen. Die geborenen Mäuse tragen entweder ausschließlich normales (Wildtyp-)Erbgut, oder als sogenannte Mosaik-Mäuse zur Hälfte Wildtyp- und zur anderen Hälfte genmanipuliertes Erbgut. Letztere sind heterozygot. Rückkreuzungen mit heterozygoten Mäusen ergeben schließlich homozygote Knock-Out-Mäuse.

Werden Knock-Out-Mäuse geboren, deren Herstellung aus Abbildung 1.7 ersichtlich ist, besitzen sie zur Hälfte normales, also Wildtyp- und zur anderen Hälfte genmanipuliertes Erbgut, sind also heterozygot. Rückkreuzungen mit Wildtyp- und später mit heterozygoten Mäusen führen schließlich zu homozygoten Knockout-Tieren. Bei ihnen ist das gewünschte Gen in allen Zellen ausgeschaltet. So können ganze Knock-Out-Linien aufgebaut werden, die sich häufig in Lebensdauer, Aussehen und Gewicht nicht von herkömmlichen Mäusezuchtlinien unterscheiden (Aller et al., 2005; Donner et al., 2010; Petric et al., 2012).

Es gibt viele bereits identifizierte Gene, für die transgene Mausmodelle zur Verfügung stehen – auf der Internetseite der Organisation EMMA sind es knapp 4.000 (European Mouse Mutant Archive, 2014). Bei nur einem Bruchteil von ihnen wurden bisher Untersuchungen getätigt, die das Herz-Kreislaufsystem betreffen (siehe Publikationen des EMMA, 2014).

Unserer Arbeitsgruppe stehen mit den Pannexin-1 und TASK-1-Mäusen zwei verschiedene solcher kardial bisher (teilweise) unerforschter transgener Mausmodelle zur Verfügung, die uns im Idealfall dabei helfen könnten, die Wirkungsweise beider Gene besser zu verstehen und damit festzustellen, ob sie bei kardialen Erkrankungen des Menschen beteiligt sind.

1.6 Pannexin-1: Struktur, Expression und Funktion

1.6.1 Struktur und Funktion von Pannexinproteinen

Pan (griechisch): überall

Nexus (lateinisch): Verknüpfung (Kienitz et al., 2011)

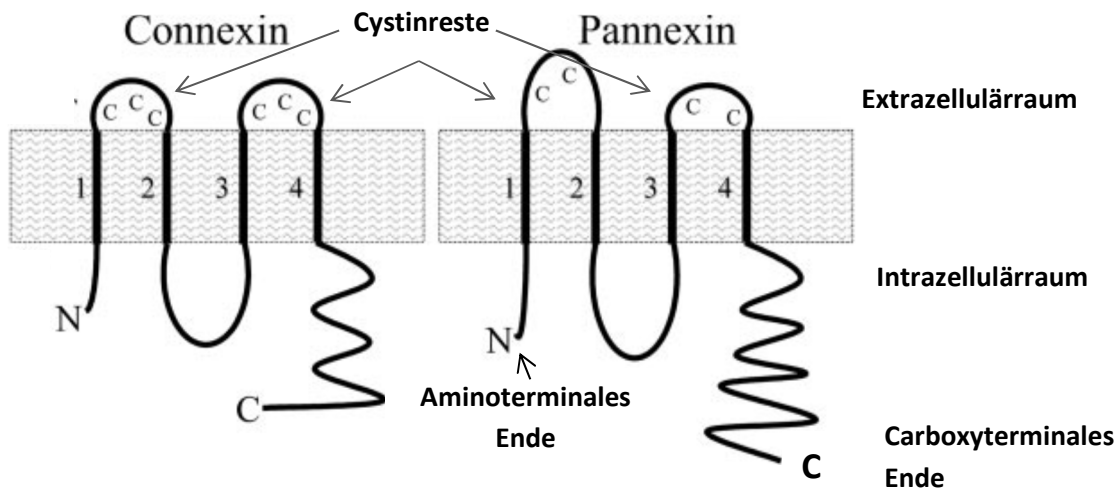


Abbildung 1.8: Vergleich der Strukturen von Connexin und Pannexin

Modifiziert nach Boassa et al., 2007

Connexine und Pannexine unterscheiden sich durch die Anzahl der Cystinreste in ihren extrazellulären Schleifen: Bei Pannexinen sind es jeweils 2 und bei Connexinen 3 Cystinreste. Die Zahlen 1-4 in der Abbildung zeigen die transmembranösen Domänen aus jeweils 20 Aminosäureenden.

Bei Mäusen und Menschen wurden bisher je drei verschiedene Pannexinproteine (panx1, panx2 und panx 3 bei der Maus; PANX1, PANX2 und PANX3 beim Menschen) entdeckt, während bei den wirbellosen Tieren sogar 20 verschiedene Pannexinproteine gefunden wurden (Penuela et al., 2009). Die Hydra beispielsweise hat mindestens 5 unterschiedliche Pannexingene (Panchnin, 2005).

Pannexinproteine sind strukturell homolog zu dem Prototypen der Gap Junctions, den Connexinen (Swayne et al., 2010), bilden aber aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen eine eigene Familie.

Zwischen den Innexinen, den Gap-Junction-bildnenden Proteinen der Wirbellosen und den Pannexinen, besteht eine Sequenzhomologie (Swayne et al., 2010; Bruzzone et al., 2003). Beide gehören also der gleichen Superfamilie an (Bruzzone et al., 2003).

Pannexine und Innexine haben eine Sequenzähnlichkeit von 20% (Panchnin, 2005), wohingegen zwischen Pannexinen und Connexinen keine Sequenzhomologie besteht (Baranova et al., 2004).

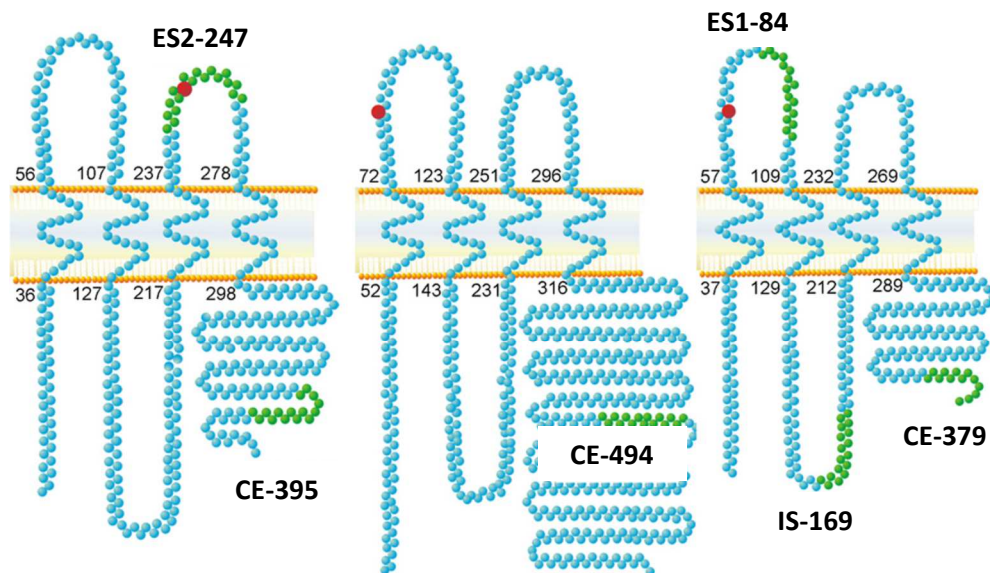
Wie die Connexine, besitzen auch die Pannexinproteine vier transmembranöse Domänen, jede aus 20 Aminosäureenden (Penuela et al., 2009), sowie zwei extrazelluläre Schleifen und ein intrazellulär liegendes carboxy- und aminoterminal Ende. In den extrazellulären Schleifen befinden sich, anders als bei den Connexinen, zwei Cystinreste (Barbe et al., 2006), die die transmembranösen Schleifen verbinden. Im Gegensatz zu den Connexinen scheinen Pannexinproteine keine interzellulären Verbindungen (Gap Junctions), sondern vielmehr als glykolysierte Proteine an der transluminalen Zellmembran sogenannte "Hemichannels" auszubilden (Scemes et al., 2007; Barbe et al., 2006).

Die initiale Glykolysierung findet dabei im endoplasmatischen Retikulum statt; eine eventuelle Modifikation erfolgt auf dem Weg zur Plasmamembran im Golgiapparat (Boassa et al., 2008). Unglykolysiert bleibt Pannexin-1 intrazellulär und wird nicht auf der Zelloberfläche exprimiert (Boassa et al., 2008).

Die oben erwähnten Hemichannels - auch Single-Membrane-Channels - erlauben den Austausch von Molekülen zwischen Zytoplasma und Extrazellulärraum (Barbe et al., 2006).

Inhibiert werden Pannexinproteine ohne gleichzeitige Beeinflussung der Connexinkanäle von Probenecid bei Konzentrationen bis 1 mmol (Silverman et al., 2008). Eine direkte Inhibition erfolgt durch extrazelluläres ATP in Konzentrationen bis 10 mmol (Ma et al., 2009).

Die Fähigkeit der Pannexinproteine, induziert durch ATP ebensolches freizusetzen, die Öffnung der Kanäle bei Erhöhung des intrazellulären Calciums und ihre Unempfindlichkeit gegenüber physiologischer extrazellulärer Calciumspiegel, hat Wissenschaftler zu der Annahme gebracht, dass Pannexin eine größere Rolle bei der Verbreitung von Calciumwellen, der Vasodilatation, dem Entzündungsreaktionsbeginn und dem ischaemischen Tod von Neuronen spielen könnte (Shestopalov und Panchnin, 2008).



Panx1

Panx2

Panx3

IS=Intrazelluläre Schleife; ES=Extrazelluläre Schleife; CE=Carboxyterminales Ende

(die Zahlen dahinter zeigen jeweils die Aminosäurepositionen der transmembranösen Domänen)

Abbildung 1.9: Strukturvergleich der drei verschiedenen Pannexingene der Maus

Modifiziert nach Penuela et al., 2009

Alle 3 Pannexingene der Maus besitzen 4 transmembranöse Domänen (aus je 20 Aminosäureenden), sowie 2 extrazelluläre Schleifen und ein intrazellulär liegendes carboxy- und aminotermiales Ende. Das Carboxyterminale Ende von Pannexin-2 ist wesentlich länger, als das der anderen beiden Pannexine.

1.6.2 Expression und Funktion von Pannexin-1

Pannexin-1 lässt sich als einziges der drei Pannexinproteine ubiquitär nachweisen (Barbe et al., 2006), besonders stark ist seine Expression unter anderem in Erythrozyten, Endothelzellen und Astrozyten, wo sie an der Freisetzung von ATP beteiligt sind (Wang et al., 2007). Seine Expression im Mäuseherzen (Ray et al., 2005; Nishida et al., 2008) wird durch Druckbelastung gesteigert (Nishida et al., 2008). Neben dem Mäuseherzen konnte Pannexin-1 auch im Sarkolemm von Hundekardiomyozyten nachgewiesen werden (Dolmatova et al., 2012).

Es ist bekannt, dass Pannexin-1 ein Ionenkanal mit einer großen Leitfähigkeit von 500 Picosiemens (Bao et al., 2004) und einer geringen Selektivität ist. Außer ATP (Bao et al., 2004) und Calciumionen können Moleküle bis zu einer Größe von 1.5 kDa diese Pore passieren; darunter Inositoltriphosphat, cAMP (Bao et al., 2007; Ducret et al., 2006) und Metaboliten wie Glukose, Laktat, Glutamat und ATP (Dolmatova et al., 2012). Swayne et al. (2010) stellten darüber hinaus eine Durchlässigkeit für Arachidonsäure und säureverwandte Lipide fest.

Pannexin-1 vermittelt unter anderem die Freisetzung von ATP aus Erythrozyten (Locovei et al., 2007) und Geschmacksknospenzellen (Huang et al., 2007); weiterhin kommt ihm auch eine Rolle als Tumorsuppressor zu. Denn eine beständige Expression von Pannexin-1 vermindert bei C6-Zellen unter anderem signifikant die Zellproliferation und die Zellbewegung bei Monolayern, sowie *in vivo* das Tumorwachstum bei thymuslosen nackten Mäusen. Lai et al. schlussfolgern, dass der Verlust der Pannexinexpression zur Entwicklung von C6-Gliomen beiträgt, während die Aktivierung von Pannexin-1 eine tumorunterdrückene Rolle spielt (Lai et al., 2007).

Als sogenannter "*Leak channel*" im endoplasmatischen Retikulum ist Pannexin-1 an der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase beteiligt (D'Hondt et al., 2011); darüber hinaus kann es auch als Calciumkanal des endoplasmatischen Retikulums bei Prostatakrebszellen fungieren (Vanden Abeele et al., 2006).

Weiterhin deuten Elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten des Krallenfrosches darauf hin, dass Pannexin-1 Gap Junctions bilden kann (Boassa et al., 2007; Bruzzone et al., 2003), allerdings in weit geringeren Mengen, als Connexine in anderen Oozyten (Boassa et al., 2007).

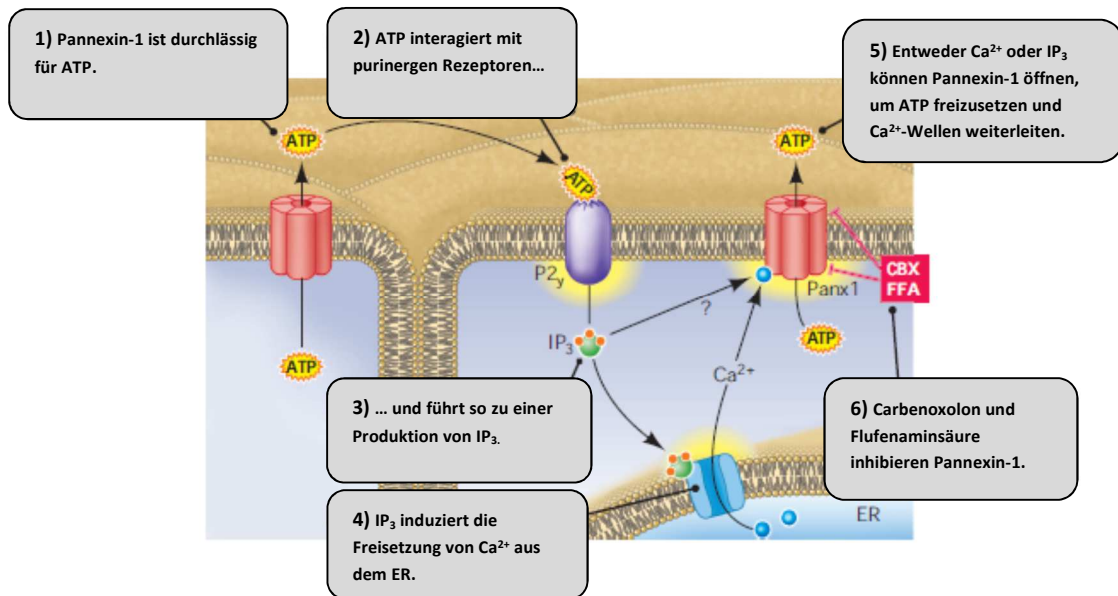


Abbildung 1.10: Die hypothetische Aufgabe von Pannexin Hemichannels bei der Übertragung von Calciumsignalen

Modifiziert nach Barbe et al., 2006

Pannexin-Hemichannels (rot) sind durchlässig für ATP und vermitteln die Calciumsignalübertragung zwischen benachbarten Zellen. Dadurch sind sie bei einer Anzahl von Prozessen während der Entwicklung und beim Adulten beteiligt. Das freigesetzte ATP interagiert mit purinergen Rezeptoren P2Y (blau), was zu einer Produktion des zweiten Botenstoffes Inositol 1,4,5-Triphosphat IP₃ (grün) führt. Dies wiederum induziert die Calciumfreisetzung aus dem ER. Entweder IP₃ oder ein calciumabhängiger Prozess bewirkt dann das Öffnen der Pannexin1-Hemichannels, was die Freisetzung von ATP und die Übertragung einer Calciumwelle gewährleistet. Calciumwellen stellen eine Form der interzellulären Signalweitergabe dar, die in verschiedenen Geweben, beispielsweise dem Gehirn, beobachtet werden können und welche aus einer koordinierten Verbreitung von Calciumströmen über eine Zellgesamtheit bestehen.

1.6.3 Kardiale Funktion von Pannexin-1

Pannexin-1 stellt den *Large Conductance Channel* der kardialen Myozyten dar, der bereits 1986 von Mechmann und Pott beschrieben wurde (Kienitz et al., 2011). Eine mechanische Dehnung dieser Kardiomyozyten erhöht die extrazelluläre ATP-Konzentration (Nishida et al., 2008). Lokal freigegebenes ATP wiederum öffnet Pannexin-1-Kanäle (Kienitz et al., 2011); bei vermehrter Öffnung oder erhöhter Expression kann Pannexin-1 potentiell arrhythmogen wirken (Kienitz et al., 2011). Gleichzeitig führt die ATP-Freisetzung aus Pannexin-1-Kanälen der Myozyten bei den Fibroblasten zur Einleitung des fibrotischen

Prozesses (Dolmatova et al., 2012). Auch nach einer transversalen Aortenkonstriktion scheint die Pannexin-1-vermittelte ATP-Freigabe über Signalkaskaden kardiale Fibrosen auszulösen (Nishida et al., 2008).

Pannexin-1 beteiligt sich nach Ischämie oder mechanischem Stress in der glatten Muskulatur und dem Gefäßendothel an der Vasokonstriktion und Vasodilatation (Billaud et al., 2011; Locovei et al., 2006). Seine Expression wird in der frühen Ischämiephase erhöht (Dolmatova et al., 2012).

1.6.4 Modulation und Inhibition von Pannexin-1

Eine Eigenschaft, die Pannexin-1-Kanäle von den meisten Connexin-Hemichannels abgrenzt, ist die fehlende Sensitivität für extrazelluläres Calcium. Das bedeutet, dass Pannexin-1-Kanäle sich, anders als die Connexinkanäle, auch unter physiologischen Ionenkonditionen öffnen können (Kienitz et al., 2011).

Geöffnet wird der mechanosensitive Pannexin-1-Kanal (Bao et al., 2004; Pelegrin und Surprenant, 2009) durch Membrandepolarisation, mechanische Stimulation, ATP, intrazelluläres Calcium und extrazelluläres Kalium (Bao et al., 2004; Locovei et al., 2006; Silverman et al., 2009). Die Schließung des Pannexin-1-Kanals wird ausgelöst durch eine Kohlendioxid-vermittelte Ansäuerung, negatives Feedback von ATP, sowie pharmakologisch durch die Kanalblocker Carbenoxolon, Probenecid, Flufenaminsäure (Iglesias et al., 2008; Qiu und Dahl, 2009; Silverman et al., 2008).

1.6.5 Funktion und Vorkommen von Pannexin-2 und -3

Pannexin-2 wurde bisher am häufigsten im Gehirn und zentralen Nervensystem gefunden, zusätzlich in kleineren Mengen auch in Auge, Schilddrüse, Prostata, Niere und Leber (Barbe et al., 2006; Bruzzone et al., 2003). Es ist bei der Regulation des zeitlichen Ablaufs der neuronalen Differenzierung beteiligt (Swayne et al., 2010).

Pannexin-3 wird überwiegend in der Haut nachgewiesen, aber auch in den Gelenken (Barbe et al., 2006; Swayne et al., 2010) und der Cochlea (Iwamoto et al., 2010; Ishikawa et al., 2011). Es fördert die Ausdifferenzierung von Osteoblasten und *ex vivo* auch das

Wachstum der Metatarsalknochen (Ishikawa et al., 2011). Im Knorpel reguliert es die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten (Iwamoto et al., 2010).

1.6.6 Vergleich der Pannexinproteine untereinander und zwischen Maus und Mensch

Vergleicht man die einzelnen Pannexinproteine der Maus bezüglich ihrer Protein- und Aminosäuresequenzen miteinander, zeigt sich eine Übereinstimmung von 48-59%. Bei den drei Pannexinproteinen des Menschen sind es sogar 51-62%. Die Sequenzhomologie ist bei beiden Spezies zwischen Panx1 und Panx 3 beziehungsweise PANX1 und PANX3 am größten. Zwischen den Mäuse- und den Menschenpannexinproteinen besteht eine 93-94% Übereinstimmung (Penuela et al., 2009).

Die Gene, die für Panx1 und Panx3 codieren, liegen bei Mensch und Maus auf jeweils demselben Chromosom (Chromosom 11 beim Menschen, Chromosom 9 bei der Maus; Baranova et al., 2004).

Das Vorkommen der Pannexinproteine beim Menschen unterscheidet sich von ihrer Verteilung bei der Maus:

So wurden große Mengen PANX1 in den Gonaden, dem Herzen und der Skelettmuskulatur gefunden, während PANX2 bisher nur im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden konnte (Baranova et al., 2004; Barbe et al., 2006).

PANX1 befindet sich beim Menschen vornehmlich im Stratum Granulosum und Spinosum der Epidermis, während sich PANX3 über alle vitalen Schichten der Epidermis gleichmäßig verteilt (Penuela et al., 2007).

1.6.7 Geplante Untersuchungen an Pannexin-1-defizienten Mäusen

Zum Vergleich der **anthropometrischen Daten** sollen in der vorliegenden Arbeit die Körper- und Herzengewichte beider Pannexin-1-Genotypen ermittelt, ihre Tibiae ausgemessen und die daraus resultierenden Quotienten (Herzgewicht/Körpergewicht, Herzgewicht/Tibiallänge) gegenübergestellt werden.

Ob eine Pannexin-1-Defizienz zu strukturellen Veränderungen des Herzens führt, soll an formalinfixierten Herzschnitten beider Pannexin-1-Genotypen histologisch untersucht werden.

Unter zwei verschiedenen Injektionsnarkosen (Avertin® und Isofluran) werden **Oberflächen-EKGs** beider Genotypen aufgenommen und verglichen. Damit möchten wir herausfinden, inwieweit eine Pannexin-1-Defizienz EKG-Parameter verändert.

Durch eine **Elektrophysiologischen Untersuchung (EPU)** sollen mit Hilfe eines intrakardialen Katheters Refraktärzeiten und AV-Überleitungszeiten bei Pannexin-1-Mäusen beider Genotypen bestimmt und untersucht werden, ob eine erhöhte atriale oder ventrikuläre Vulnerabilität vorliegt.

Um Herzfrequenzen, EKG-Intervalle und eventuell spontanen Arrhythmien über einen längeren Zeitraum zu beobachten, werden Pannexin-1-Mäusen beider Genotypen Telemetrietransmitter implantiert und **Langzeit-EKGs** analysiert. Damit auch mögliche Veränderungen während körperlicher Belastung erfasst werden, sollen die Tiere bei **Schwimm- und Laufbandversuchen** an ihre körperliche Belastungsgrenze gebracht werden.

Eine **Echokardiographie in vivo** dient dem Vergleich der Herzfunktion und -Morphologie beider Genotypen.

Die Ergebnisse könnten Wissenschaftlern bei der Erforschung von Herzkrankheiten des Menschen helfen und möglicherweise einen Teil zur Entwicklung von Gentests und lebensrettenden Medikamenten beitragen.

1.7 TASK-1: Struktur, Expression und Funktion

1.7.1 Kaliumkanäle am Herzen

Kaliumkanäle sind Proteine, die Zellmembranen überbrücken und so den passiven Austausch von Kaliumionen entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglichen (Tamargo et al., 2004). Sie kommen bei Säugetieren ubiquitär im Körper vor und stellen die größte Ionenkanalfamilie dar. Weil sie das Membranpotential anpassen, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Muskelerregbarkeit, der neuronalen Integration und der

Hormonsekretion (Coetzee et al., 1999). Darüber hinaus sind Kaliumkanäle auch bei der Regulation der Zellvolumina und der Kaliumhomöostase beteiligt (Coetzee et al., 1999; Tamargo et al., 2004).

Kaliumkanäle beeinflussen nicht nur das Ruhemembranpotential und die Herz- und Schrittmacherzellfrequenz, sondern auch Form und Länge des kardialen Aktionspotentials, Refraktärzeiten und die Herzautomatie (Tamargo et al., 2004; Nerbonne et al., 2001).

Mutationen in den Kaliumkanälen können demnach das Risiko von Arrhythmien und einem plötzlichen Herztod erhöhen (Donner et al., 2010).

Kaliumkanäle lassen sich in 3 große Untergruppen gliedern (Tamargo et al., 2004):

- 1) **K_v-Kanäle (*voltage-gated*):** bestehen aus 6 transmembranösen Segmenten und einer porenbildenden Region. Kanäle öffnen sich direkt nach der Repolarisation.
- 2) **K_{ir}-Kanäle (*inward rectifier*):** bestehen aus 2 transmembranösen Domänen, die über eine Pore miteinander verbunden sind. Sie führen Kaliumströme eher ins Zellinnere und können Homo- oder Heterotetramere bilden.
- 3) **K_{2P}-Kanäle:** bestehen aus 4 transmembranösen Segmenten und 2 porenbildenden, hintereinander angeordneten Schleifen (Lesage und Lazdunski, 2000). Sie können als Homo- oder Heterodimere auftreten. Die Kaliumströme folgen der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung und führen so zu einem Ausgleich der Kaliumionenkonzentration auf beiden Seiten der Zellmembran (Bockenhauer et al., 2001). Dadurch erhalten sie das Ruhemembranpotential (Lesage und Lazdunski, 2000; Tamargo et al., 2004). Weil sie weder spannungsabhängig arbeiten, noch ligandengesteuert sind, zählen K_{2P}-Kanäle zu den Hintergrundkaliumkanälen (Bockenhauer et al., 2001; Lopes et al., 2001; Kim et al., 2001).

Die Familie der K_{2P}-Kanäle besteht aus mindestens 15 Proteinen, die zwar eine ähnliche Struktur besitzen, aber außerhalb der Poren andere Proteinsequenzen aufweisen (Lesage und Lazdunski, 2000; Bayliss et al., 2003). Am Herzen sind die 4 wichtigsten K_{2P}-Kanäle: TASK, TWIK, TREK und THIK (Tamargo et al., 2004; Gurney und Manoury, 2009).

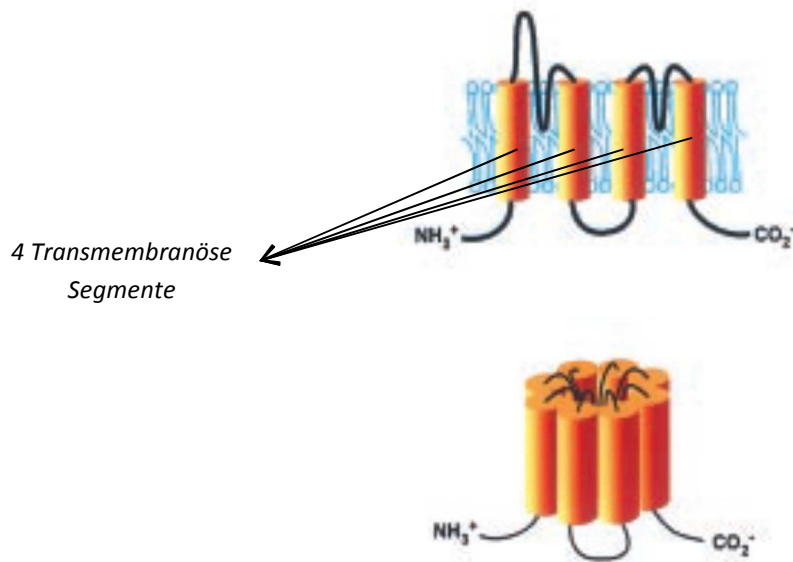


Abbildung 1.11: Molekularer Aufbau der K_{2P} -Kanäle
Modifiziert nach Nerbonne et al., 2001

Die K_{2P} -Kanäle bestehen aus 2 porenbildenden, hintereinander angeordneten Schleifen und 4 transmembranösen Segmenten. Durch den Ausgleich der Kaliumkonzentrationen auf beiden Zellmembranseiten erhalten sie das Ruhemembranpotential.

1.7.2 Expression, Funktion, Hemmung und Aktivierung von TASK-1

TASK= TWIK-related acid sensitive K^+ -channel (Lesage und Lazdunski, 2000)

Neben seiner **Expression** im Herzen konnte TASK-1 auch in anderen Geweben wie dem Nervensystem, Glomus caroticum, der Nebennierenrinde, Lunge und Niere nachgewiesen werden (Bayliss et al., 2003; Czirjak et al., 2000; Duprat et al., 1997; Gurney et al., 2003; Yamamoto et al., 2002).

Seine **Funktion** ist bei ventrikulären Kardiomyozyten an die Hintergrundkaliumströme gebunden, was bedeutet, dass TASK-1 die Aktionspotentialdauer beeinflusst (Backx und Marban, 1993). Weil TASK-1-Kanäle im menschlichen Vorhof für einen bedeutenden Teil der Hintergrundströme verantwortlich sind, könnten sie eine funktionale Bedeutung bei der Entstehung des Vorhofflimmerns haben (Limberg et al., 2011) und aufgrund ihrer Beeinflussung von Repolarisation und autonomen kardialen Reflexen scheinen sie eine wichtige Rolle bei der Herzkreislauffunktion zu spielen (Donner et al., 2010).

TASK-1 reagiert auf ein großes Spektrum physiologischer und pathologischer Bedingungen: So wird es beispielsweise gehemmt durch eine Hypoxie und niedrige, noch an der physiologischen Grenze liegende extrazelluläre pH-Werte (Duprat et al., 1997).

Zusätzlich hemmt auch der plättchenaktivierende Faktor Proteinkinase C ϵ TASK-1, was bei isolierten Kardiomyozyten der Maus zu einer Verzögerung der Repolarisation und zum Auftreten von frühen Nachdepolarisationen führt (Barbuti et al., 2002 und Besana et al., 2004). Signalmoleküle wie Phospholipase C und Proteinkinase C vermitteln dabei die Inhibition des TASK-1 (Besana et al., 2004; Czirjak et al., 2001).

Pharmakologisch kann TASK-1 geblockt werden durch Zn^{2+} (Leonoudakis et al., 1998) und durch das Endocannabinoid Anandamid und sein stabiles Analogon Methanandamid (Maingret et al., 2001). Auch der spezifische TASK-1-Kanalblocker A293 und der $\alpha 1$ -adrenerge Agonist Methoxamin inhibieren TASK-1 bei isolierten kardialen Myozyten der Ratte ähnlich stark, wie eine extrazelluläre Ansäuerung des pH-Wertes auf 6. Es kommt dadurch zu einer signifikanten Verlängerung des Aktionspotentials (Putzke et al., 2007).

Aktiviert wird TASK-1 hingegen schon durch pharmakologische Konzentrationen von Inhalationsanästhetika wie Halothan und Isofluran (Patel et al., 1999; Sirois et al., 2000; Talley und Bayliss, 2002). Die Proteinkinase A ist bei der Aktivierung beteiligt (Olschewski et al., 2006).

TASK-1^{-/-}-Mäuse erscheinen gesund, haben eine normale Lebenserwartung und ein unauffälliges Fortpflanzungsverhalten (Aller et al., 2005; Donner et al., 2010; Petric et al., 2012). Größe, sowie Morphologie von Gehirn und Herz unterscheiden sich nicht von den TASK-1-Wildtypen (Aller et al., 2005; Donner et al., 2010). TASK-1-defiziente Mäuse weisen aufgrund veränderter zerebellarer Funktion eine beeinträchtigte motorische Leistung auf (Aller et al., 2005) und die TASK-1-Defizienz führt bei einem Teil der Tiere zu Hyperaldosteronismus (Davies et al., 2008; Heitzmann et al., 2008).

1.7.3 Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zu TASK-1-defizienten Mäusen

In Vorarbeiten konnte unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen Untersuchungen bereits erste Daten zur kardialen Phänotypisierung der TASK-1-defizienten Maus erarbeiten:

So ergab die **Genexpressionsanalyse** ein vermehrtes Vorkommen von TASK-1 in den Ventrikeln von TASK-1-Wildtypen, während sich die Expression der 7 anderen K₂P-Kanäle bei Real-Time-PCR- und Immunoblotuntersuchungen bei TASK-1^{-/-}-Mäusen als unverändert darstellte. Somit führt ein Fehlen von TASK-1 nicht automatisch zur Hochregulation der anderen K₂P-Kanäle (Donner et al., 2010).

Patho-Histologische und echokardiographische Untersuchungen zeigten keinerlei funktionelle oder strukturelle Unterschiede zwischen den Herzen beider Genotypen. Auch die **anthropometrischen Daten** der TASK-1^{+/+}- und TASK-1^{-/-}-Mäuse stimmten überein (Donner et al., 2010).

Die Aufnahme **monophasischer Aktionspotentiale (MAPs)** an der Langendorffapparatur stellte eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentialdauer bei spontan schlagenden und atrial stimulierten Herzen dar (Donner et al., 2010).

Das QTc-Intervall war unter Ketamin/Xylazin-Narkose im **Oberflächen-EKG** bei TASK-1-defizienten Tieren signifikant verlängert (Donner et al., 2010 und Decher et al., 2011). Weder im **24-Stunden-EKG**, noch bei körperlicher Belastung oder medikamentös ausgelöstem Stress, kam es zu einem erhöhten Auftreten von Arrhythmien. Die Infarktgröße nach **Ischämie/Reperfusion** war bei beiden Genotypen vergleichbar (Donner et al., 2010). Allerdings hatten TASK-1^{-/-}-Mäuse höhere durchschnittliche Herzfrequenzen und eine signifikant erniedrigte **Heart Rate Variability (HRV)** (Donner et al., 2010).

1.7.4 Geplante Untersuchungen an TASK-1-defizienten Mäusen

Um einen möglichen Einfluss von Anästhetika und β -adrenerger Stimulation auf die Repolarisation von TASK-1^{+/+}- und TASK-1^{-/-}-Mäusen auszuschließen, sollen in der vorliegenden Arbeit **Oberflächen-EKGs** unter verschiedenen bei der Maus gebräuchlichen Narkosemitteln wie Pentobarbital und Avertin® aufgenommen und insbesondere die QTc-Intervalle analysiert werden.

Basierend auf dem Ergebnis der bereits durchgeführten HRV-Untersuchung wird im Folgenden die **Heart Rate Turbulence (HRT)** beider TASK-1-Genotypen analysiert werden. Dieses Phänomen bezieht sich auf Schwankungen der Sinuszykluslänge nach einzelnen vorzeitigen, mit einem bipolaren Katheter ausgelösten, ventrikulären Kontraktionen (Bauer et al., 2008).

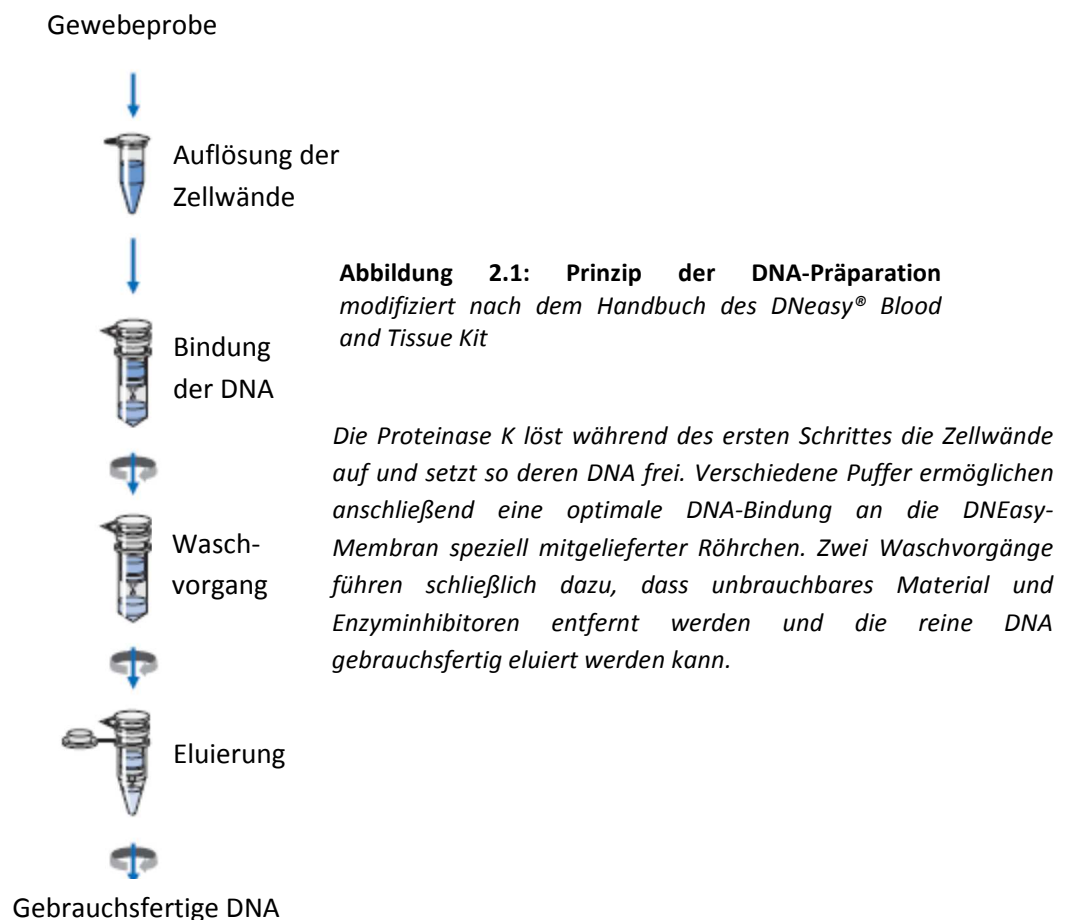
Darüber hinaus sollen in der vorliegenden Arbeit bei einer **elektrophysiologischen Untersuchung (EPU)** neben den Überleitungs- und Refraktärzeiten auch die Vulnerabilitäten von TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen *in vivo* durch programmierte, mit einem Oktapolarkatheter generierte, intrakardiale Stimulation bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Genotypisierung von Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen

2.1.1 DNA-Präparation aus Schwanzspitzen

Die DNA-Präparation mittels des DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden) erfolgte aus etwa 3 mm langen knochenlosen Schwanzspitzen, die den Mäusen beim Absetzen im gleichen Zuge mit der Ohrmarkierung entnommen wurden.



Reinheit und Konzentration der DNA wurden photometrisch bestimmt (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA).

Grundlagen der *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Die PCR ist ein häufig genutztes molekulargenetisches Verfahren, welches die beliebige Replikation von DNA-Stücken erlaubt. Dabei reicht prinzipiell ein einziges DNA-Segment aus (Linder Biologie, 1998).

Ihr Grundsatz besteht aus einem **Erhitzen der DNA auf 94°C**, das zur Denaturierung der Proteine und damit zum Auftrennen der doppelsträngigen DNA-Fragmente führt. Anschließend kommt es bei einer geringeren Temperatur von 50-60°C, je nach Primer, zum **Primer Annealing**, der Bindung des Primers an das jeweilige Gegenstück auf der einsträngigen DNA. Sind alle 4 Nucleotidbausteine (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) und eine hitzestabile DNA-Polymerase vorhanden, beginnt letztere bei erneuter Erhöhung der Temperatur auf etwa 70°C mit der **Primer Extension** oder Elongation: Sie füllt Einzelstränge mit freien Nukleotiden auf und führt so zu neusynthetisierten Komplementärsträngen. Für jeden DNA-Strang ist dazu ein (synthetisch herstellbarer) Primer notwendig, der zu den Enden des gewünschten DNA-Stückes komplementär ist. Seine Sequenz muss also bekannt sein.

Im Anschluss wird die Temperatur erneut auf 94°C erhöht, wodurch sich die frisch synthetisierten DNA-Doppelstränge wieder trennen und der Kreislauf von vorne beginnt. Bereits nach 25 Zyklen erhält man so theoretisch 2^{25} Kopien der Ausgangssequenz (Linder Biologie, 1998).

2.1.2 PCR zur Genotypisierung der Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäuse

Pannexin-1-Knockout-Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Monyer und Anne Herb in Heidelberg aus C57Bl/6 x 129 SV-Mäusen generiert (Bargiotas et al., 2011). Dabei wurde das Pannexin-1-Gen durch Einfügen eines LacZ-Gens und einer Phosphoglyceratkinase-Neomycin-Kassette ins Exon 1 mittels homologer Rekombination unterbrochen (Details unter Anselmi et al., 2008). Im Anschluss wurde die Linie zurückgekreuzt auf C57Bl/6 und heterozygote Tiere (Pannexin-1^{+/-}) verpaart. Dies führte zu Pannexin-1-defizienten Mäusen nach den Mendelschen Regeln; also 50% heterozygote Nachkommen und jeweils 25% homozygote Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäuse.

Die Genotypisierungs-PCR wurde mit den dafür nötigen Primersequenzen durchgeführt wie bei Anselmi et al. (2008) beschrieben.

2.1.3 PCR zur Genotypisierung der TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäuse

Die Basensequenzen der für die Genotypisierungs-PCR verwendeten Primer, sowie die Durchführung der PCR wurden übernommen von Aller et al. (2005) und Donner et al. (2010).

2.2 Zucht der Pannexin-1- und TASK-1-Mausstämme

Für unsere Versuche konnten wir auf zwei eigene Mausstämme zurückgreifen, die durch fachkundiges Personal in der Tierversuchsanlage (TVA) der Universität Düsseldorf betreut wurden. Die TVA befolgt alle Vorgaben des National Institute of Health zur Pflege und Verwendung von Labortieren (NIH Publication No. 85-23, überarbeitet 1996) und die des deutschen Tierschutzgesetzes.

Die Pannexin-1- und TASK-1- defizienten Tiere wurden in Heidelberg von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Monyer aus C57Bl/6N- bzw. C57Bl/6J- Mäusen entwickelt. Diese Arbeitsgruppe stellte uns je 2 heterozygote Zuchtpaare (10-fache Rückkreuzung bei beiden) zur Verfügung, aus der unsere gesamten Populationen hervorgingen. Für unsere Zucht wurden jeweils heterozygote Tiere verpaart, um bei Versuchen Wurfgeschwister einsetzen zu können.

Alle Tiere erhielten jederzeit freien Zugang zu pelletiertem und autoklavierten Futter (ssniff M-Zucht® beziehungsweise ssniff R/M-Haltung®, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und zuvor der Haltbarkeit wegen mit Ozon und Salzsäure behandeltem Leitungswasser (pH 2,6 bis 3,0) aus Plastiktränkeflaschen. Sie wurden soweit möglich in kleinen Gruppen von zwei bis fünf Tieren in 14 cm hohen Makrolonkäfigen Typ II (350 cm³) oder Typ III (800 cm³) auf entstaubtem Weichholzgranulat gehalten. Hell- und Dunkelphasen wurden im Wechsel zwischen 7 und 19 Uhr automatisch generiert, wobei die Beleuchtung mit 320 Lux tagsüber stattfand. Die Räume waren bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5%

auf $22 \pm 2^\circ\text{C}$ temperiert. Einstreu, Futter und Wassergefäße sowie eventuelle Nester wurden einmal wöchentlich gewechselt.

Verpaart wurden weibliche Mäuse ab einem Alter von acht bis zehn Wochen, männliche ab sechs Wochen. Wenn weibliche Mäuse nach vier Wochen nicht tragend waren, wurden die Zuchtpaare aufgelöst und mit einem anderen Männchen neu angesetzt. In der Regel wurden Elternpaare bei der Aufzucht nicht getrennt. Jungtiere blieben mindestens drei Wochen lang bei ihren Eltern und wurden im Anschluss- nach Geschlechtern getrennt- abgesetzt. Dabei wurden Schwanzspitzen für die Genotypisierung und Ohrstanzen zur Tiermarkierung entnommen.

Ein für jeden Stamm angelegtes Zuchtbuch ermöglichte jederzeit eine Nachverfolgung von Verwandtschaftsgraden, Zuchterfolgen und Mortalitätsraten.

2.3 Genehmigungen der Tierversuche

Alle Versuchsvorhaben wurden zuvor von der Bezirksregierung Düsseldorf unter den Aktenzeichen O3/2002, G32/2010, G73/2011 und G254/2012 genehmigt.

2.4 Körperparameter der Pannexin-1^{-/-}- und Pannexin-1^{+/+}-Mäuse

Zwar scheinen sich Pannexin-1-defiziente Mäuse bezüglich der anthropometrischen Daten wie Größe und Gewicht nicht von ihren Wildtypwurfgeschwistern zu unterscheiden (Aller et al., 2005; Dvorianchikova et al., 2012). Unklar ist allerdings, ob die Herzgewichte und die beiden daraus resultierenden Quotienten (Herzgewicht/Körpergewicht und Herzgewicht/Tibiallänge) ebenfalls gleich sind.

Um dies zu untersuchen, wurden Pannexin-1 Wildtyp (WT)- und Knockout (KO)-Mäuse direkt nach der Tötung durch zervikale Dislokation gewogen. Ihre Herzen wurden entnommen, von umgebendem Fettgewebe befreit, gründlich in PBS (PAA Laboratories, Les Mureaux, Frankreich) gespült und vor der Fixierung mit Flüssigstickstoff oder Formalin auf einer Feinwaage (Firma Sartorius, Göttingen) gewogen. Die rechte Tibia der Tiere wurde freipräpariert und ihre Knochenlänge mit einer Präzisionsschieblehre gemessen.

Die Tibiaknochenlänge der Maus unterliegt nämlich ab etwa dem 70. Lebenstag im Gegensatz zur geschlechts- und fütterungsabhängigen Körpermasse nachweislich kaum Veränderungen (Tiemann et al., 2003).

Nur wenn die Körperparameter beider Genotypen keinen wesentlichen Unterschied aufweisen, können die Versuchsergebnisse miteinander verglichen werden.

2.5 Histopathologische Untersuchung der Herzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Zu einer vollständigen kardialen Phänotypisierung *in vivo* zählt auch die histopathologische Beurteilung von formalinfixierten Mäuseherzen. Sie dient insbesondere dem Ausschluss struktureller Unterschiede zwischen den Pannexin-1^{-/-} und Pannexin-1^{+/-}-Tieren und erfasst zudem das eventuelle Auftreten von Fibrosen und Speichersubstanzen.

Dazu töteten wir Mäuse mittels cervikaler Dislokation und entnahmen zügig ihre Herzen. Diese spülten wir in PBS-Lösung (PAA Laboratories, Les Mureaux, Frankreich) um sie von Blutresten zu befreien und legten sie in Formalin ein. Im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden daraus anschließend mehrere 4µm dünne Schnitte angefertigt - insbesondere solche, bei denen (analog zum Vierkammerblick in der Echokardiographie) gleichzeitig beide Kammern und Vorhöfe sichtbar waren. Diese Schnitte wurden anschließend auf 2 verschiedene Arten gefärbt (Hämatoxylin/Eosin und van Gieson) und in 20-40 facher Vergrößerung mikroskopisch (Leica DM2000, Leica, Wetzlar) hinsichtlich Fibrose, Hypertrophie, Muskelzellkerngröße und strukturellen Auffälligkeiten beurteilt. Außerdem wurden die Durchmesser der Ventrikelwände ausgemessen. Alle Herzen wurden ohne Kenntnis der Genotypen von zwei unabhängigen Pathologen untersucht.

2.6 Ableitung, Aufzeichnung und Analyse von Oberflächen-EKGs bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosemitteln

Eine einfache und aufschlussreiche Untersuchungsmethode bei der lebenden Maus ist die Aufzeichnung eines Oberflächen-EKGs. Es lässt eventuelle Unterschiede zwischen den Genotypen erkennen und zeigt die Auswirkungen verschiedener Narkotika auf Herzfrequenzen und –Intervalle auf. Bisher sind unserem Wissen nach noch keine Daten über die EKG-Intervalle bei Pannexin-1-defizienten Mäusen publiziert worden. Oberflächen-EKGs bei Mäusen ohne Narkose abzuleiten, ist aufgrund der Bewegungsartefakte unmöglich.

Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse wurden dementsprechend sediert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert. EKG-Nadeln mit einem Durchmesser von 29 Gauge (ADInstruments, Spechbach) wurden subkutan im Bereich beider Achseln und des linken Hinterbeins appliziert und die EKG-Aufnahme gestartet.

Um eine Corneaaustrocknung zu vermeiden, wurden beide Augen mit einer handelsüblichen Augensalbe (z. Bsp. HYLO®-Gel, Ursapharm, Saarbrücken) bedeckt.

Möglichst artefaktfreie Elektrokardiogramme wurden mit einem Powerlab 8/30 verbunden mit einem BioAmp (alles ADInstruments, Spechbach) mit einer Samplingrate von 1kHz mindestens 60 s lang aufgezeichnet und mit der LabChart-Software (Version 7.2) ausgewertet.

Pro Maus wurden 60 Herzzyklen bezüglich Herzfrequenzen, RR- Intervalle, PR-Zeiten, QRS-Dauern, R- und P-Amplituden, QT-Zeiten und frequenzkorrigierte QT-Intervalle nach Mitchell (Mitchell et al., 1998; $QT_c = QT_0 / (RR_0/100)^{1/2}$) analysiert. Lediglich die R-Spitze war von der Auswertesoftware vorgegeben. Das Ende der biphasischen T-Welle wurde definiert als der Punkt, an dem sie zur isoelektrischen Linie zurückkehrt und diese schneidet (Mitchell et al., 1998). Alle Daten wurden von 2 unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Genotypen untersucht.

TASK-1-defiziente Mäuse zeigten bei vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe unter Ketamin/Xylazin-Narkose eine signifikante QT_c-Verlängerung (Donner et al., 2010). Um zu überprüfen, ob dies an der Narkose lag, oder ein allgemeines Kennzeichen von

TASK-1-defizienten Mäusen darstellt, zeichnen wir Oberflächen-EKGs mit zwei weiteren häufig bei Mäusen verwendeten Narkotika auf.

2.6.1 Isoflurannarkose bei Pannexin-1^{+/+} und Pannexin-1-defizienten Mäusen

Isofluran ist in der Tiermedizin aufgrund seiner schnellen Narkoseein- und -ausleitung ein sehr beliebtes Inhalationsanästhetikum und wird häufig bei den narkoseempfindlichen kleinen Heimtieren verwendet. Es ist sehr gut steuerbar und führt zu einer Allgemeinanästhesie mit Muskelrelaxation. Lediglich eine Schmerzausschaltung findet nicht statt, weswegen es bei größeren und potentiell schmerzhaften Eingriffen zwingend mit einem Analgetikum kombiniert werden muss (Frey und Löscher, 2002). Isofluran wirkt vasodilatatorisch und potentiell atemdepressiv (Kraft, 2010).

Unsere Mäuse wurden zur Narkoseeinleitung einzeln in einen geschlossenen Plexiglasbehälter gesetzt, dem unmittelbar zuvor einige Tropfen Isofluran (Isofluran Actavis®, Actavis, München) zugeführt wurden. Während der Aufzeichnungsdauer von etwa fünf Minuten bekamen sie zur Narkoseaufrechterhaltung weiterhin 1,5% Isofluran und 2l/min Sauerstoff über eine Gasmasken.

2.6.2 Avertinnarkose® (Tribromoethanol) bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen

Avertin® wird häufig bei kardiologischen Untersuchungen an Mäusen eingesetzt, weil es sich durch seine gering kardiodepressive Wirkung auszeichnet (Patel et al., 1999; Lin et al., 2007). Avertin® wirkt nach intraperitonealer Injektion schnell und löst bei der Maus ein etwa 15-20 Minuten langes chirurgisches Toleranzstadium aus (Arras, 2007; Lieggi et al., 2005). Bei Nachlassen der Wirkung kann es nachgespritzt werden (Arras, 2007). Da vor allen Dingen die wiederholte intraperitoneale Injektion des Avertin® durch Verklebungen des Darmtraktes, Peritonitiden und Ileus noch Tage nach der Injektion zu Todesfällen führen kann, sollte es heutzutage nur noch nach anschließender Tötung des Versuchstieres angewendet werden (Arras, 2007). Die intraperitoneale Injektion des

5%igen Avertin® (250mg/kg) führte bereits nach zwei Minuten zu einer ausreichenden Narkosetiefe.

2.6.3 Pentobarbitalnarkose bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Pentobarbital findet in der Tiermedizin vorwiegend bei der Behandlung von Epilepsien Anwendung, wird aber aufgrund seiner geringen therapeutischen Breite auch bei Euthanasien eingesetzt. Es unterliegt dem Betäubungsmittelgesetz (Frey und Löscher, 2002; Kraft, 2010). Pentobarbital führt nach einigen Minuten zum Narkosetoleranzstadium mit Hypnose, Muskelrelaxation und Analgesie, verursacht allerdings neben einer starken Atemdepression auch eine lange Nachschlafphase. Zudem ist aufgrund seiner körpertemperatursenkenden Wirkung eine gute Temperaturüberwachung des Patienten unerlässlich (Frey und Löscher, 2002).

Die Narkoseeinleitung erfolgte hier ebenfalls durch eine intraperitoneale Injektion (Narkodorm®, CP-Pharma, Burgdorf; 30mg/kg Körpergewicht), allerdings dauerte es mit durchschnittlich etwa 20 Minuten deutlich länger als bei den anderen Narkosemitteln, bis das Narkosetoleranzstadium erreicht war. Wie bei der Avertin®-Narkose war auch hier eine gute Reflexüberwachung notwendig.

2.6.4 Kombinationsnarkose von Ketamin und Xylazin bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die kombinierte Injektionsnarkose von Ketamin (Ketavet®, Zoetis, Berlin) mit dem $\alpha 2$ -Agonisten Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen) ist in der Kleintiermedizin unter der Bezeichnung „Hellabrunner Mischung“ sehr verbreitet. Sie führt zu einer etwa 30minütigen Vollnarkose mit guter Analgesie und Muskelrelaxation. Bedacht werden muss allerdings die etwa 1-2h dauernde postnarkotische Erholungsphase mit einer Überempfindlichkeit auf Geräusche und teilweise auftretenden Ataxien (Frey und Löscher, 2002).

Ketamin selbst verursacht eine dissoziative Anästhesie (Frey und Löscher, 2002) und wirkt kaum kardiodepressiv. Es hat hypnotische und analgetische Eigenschaften, kann aber zu

Nystagmus, gesteigerter Salivation und Tachykardien führen (Frey und Löscher, 2002; Kraft, 2010). *Xylazin* alleine, ein zentraler und peripherer α_2 -Adrenozeptor-Agonist, bewirkt neben einer Sedation und Analgesie auch eine Muskelrelaxation. Als Nebenwirkungen werden hauptsächlich Hypotonie, Atemdepression und Bradykardie genannt (Frey und Löscher, 2002; Kraft, 2010).

Diese Narkose nutzten wir für die Transmitterimplantation. Durch die intraperitoneale Injektion einer Ketamin-Xylazin-Mischspritze (50mg/kg Körpergewicht Ketamin und 20 mg/kg Körpergewicht Xylazin) wurde die Narkose eingeleitet.

2.7 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) am Herzen von Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen

2.7.1 Grundlagen

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung werden über einen intrakardial liegenden Katheter elektrische Stromimpulse ausgelöst, anhand derer die Reizleitungseigenschaften im Herzen analysiert werden können (Kreuzberg et al., 2006). In der Humanmedizin läuft der Eingriff meist ohne Vollnarkose ab. Bereits in mehreren Publikationen wurden Stimulationsprotokolle zur elektrophysiologischen Untersuchung der Maus vorgestellt (Berul et al., 1996; Schrickel et al., 2007; Kreuzberg et al., 2006) die aus gängigen Protokollen der Humanmedizin übernommen und auf die höheren Herzfrequenzen der Maus angepasst wurden. Unser Stimulationsprotokoll (siehe Anhang) basiert mit kleinen Modifikationen auf den bereits publizierten Protokollen.

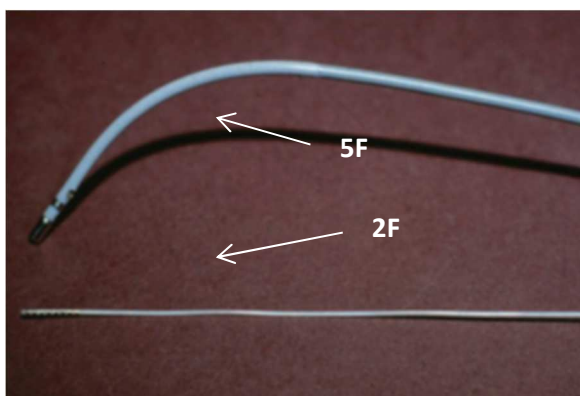


Abbildung 2.2: Elektrophysiologiekatheter für Mensch und Maus

modifiziert nach Berul et al., 2003

Oben: Elektrophysiologiekatheter für den Einsatz beim Menschen

Unten: Elektrophysiologiekatheter für experimentelle Untersuchungen an transgenen Mäusen.

Der eingesetzte Oktapolarkatheter (Ciber Mouse, NuMed Inc., NY, USA) besaß einen Durchmesser von 2 French (=0,7mm) und bestand aus acht jeweils 0,5mm breiten zirkulären Elektroden, die in ebensolchem Abstand zueinander auf dem Katheter angebracht waren.



Abbildung 2.3: Größenverhältnis des Katheters zu einer Eurocentmünze

Während die ersten beiden Elektroden distal im Bereich der Herzspitze lokalisiert waren, befanden sich die Elektroden sieben und acht proximal, also vorhofnah. Elektroden vier und fünf wiederum nahmen Signale von AV-Klappen-Höhe auf. Über jede dieser Elektroden konnte entweder ein kardiales Signal abgeleitet, oder das Herz elektrisch stimuliert werden. Dies war gerade zur Lagekontrolle des Katheters von großer Bedeutung. Ein anderer Katheter, als bei Experimenten zur Heart Rate Turbulence war erforderlich, da neben der Ableitung des Oberflächen-EKGs gleichzeitig sowohl ein intrakardiales EKG benötigt wurde, als auch elektrische Stromimpulse (mit Hilfe eines extra für Mäuse gefertigten Impulsgenerators der Firma ADInstruments, Spechbach) erzeugt werden mussten. Mit letzterem ließen sich Stromstärken, Impulsdauern und ihre Anzahl genau einstellen und dadurch verschiedene atrio-ventrikuläre Überleitungszeiten messen, Herzrhythmusstörungen lokalisieren und Burststimulationen durchführen.

2.7.2 Präparation und Katheterimplantation

Die elektrophysiologische Untersuchung wurde nach identischem Protokoll bei TASK-1 und Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen beider Geschlechter ab einem Alter von 3 Monaten durchgeführt. Während der Zugang zur Vene beim Menschen meist über die in der Leiste liegende Vena femoralis erfolgt, ist bei der Maus die Vena jugularis besser geeignet. Dies

erforderte eine vorsichtige Präparation in der empfindlichen Halsregion des Tieres und musste zwingend in tiefer Sedierung stattfinden.

Bereits wenige Minuten nach der Avertin®-Injektion war die gewünschte Narkosetiefe erreicht und die Maus konnte in Rückenlage auf einer körperwarmen Heizplatte (Small Operating Table, BioScience, Sheerness, UK) fixiert werden, wobei ihr Kopf zum Untersucher hin zeigte. Die Hinterbeine wurden bewusst freigelassen, da sie zur Überprüfung der Reflexe und damit der Narkosetiefe dienten. Reagierten die Tiere auf ein Pinzettenkneifen zwischen den Zehen mit Zurückziehen des Beines, wurden 100µl des 5%igen Avertin® nachgespritzt. Das Oberflächen-EKG wurde angelegt und die Aufnahme gestartet. Es half dabei, die Narkosetiefe während der Präparation zu überwachen, denn eine steigende Herzfrequenz korrelierte immer mit einer sinkenden Narkosetiefe. Wie bei allen anderen Operationen wurden auch hier die Augen der Versuchstiere mit gebräuchlichen Augensalben (z. Bsp. HYLO®-Gel, Ursapharm, Saarbrücken) vor dem Austrocknen geschützt.

Anschließend wurden die Mäuse im Bereich ihres rechten Vorderbeines bis zum Sternum mit einem elektrischen Rasierer (Contura, Wella, Darmstadt) enthaart. Auf halber Höhe einer gedachten Linie zwischen Kopf und rechtem Vorderbein eröffneten wir die Haut durch einen 2mm kleinen Schnitt. Alle weiteren Schritte wurden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Stereo Zoom Microscope, Modell GZ6, Leica Microsystems, Wetzlar) und passender Lichtquelle (KL 1500 LCD, Leica Microsystems, Wetzlar) bewerkstelligt. Mittels stumpfer Präparation lagerten wir nun die rechte Vena jugularis vor und befreiten sie vorsichtig vom umliegenden Fettgewebe. Mit einem Seidenfaden (No. 18020-60, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) wurde sie im kranialen Teil abgebunden und ein zweiter Knoten, der jedoch nicht komplett zugezogen wurde, etwa 1cm kaudal des ersten angebracht.



Abbildung 2.4: Blick durchs Mikroskop während der OP

Faden kranial um die Vena jugularis zugezogen, kaudaler Knoten offen. Die Maus liegt mit dem Kopf zum Untersucher.

Zur Straffung der Vene und damit zur besseren Übersicht wurde an den beiden Fadensträngen, die den ersten Knoten bildeten, eine Klammer befestigt. Während die Vene mit einer Mikropinzette etwas gespreizt wurde, fügten wir ihr mit der Spitze einer Mikroschere seitlich einen winzigen Schnitt zu, ohne sie dabei zu durchtrennen. Dabei sollte kein Blut aus der Vene austreten. Der vorher sicher am Tisch fixierte Oktapolarkatheter wurde nun mit Hilfe der Mikropinzette in die winzige Venenöffnung geschoben. Hierbei war eine kurzfristige minimale Blutung aus der Eintrittsstelle beweisend für die richtige Lage des Katheters. Dieser sollte sich nun ohne Widerstand innerhalb der Jugularvene bis ins rechte Atrium und den rechten Ventrikel vorschieben lassen. Eine gute Lagekontrolle erhielt man, wenn man den Katheter während des Vorschiebens mit den am weitesten distal gelegenen Elektroden (e) 1 und 2 intrakardial messen ließ. Die richtige Position war erreicht, wenn im intrakardialen EKG keinerlei Vorhofsingnal mehr zu erkennen, die Kammersignale hingegen deutlich waren.



Abbildung 2.5: Die freipräparierte und abgebundene Vena jugularis vor dem Einführen des Oktapolarkatheters

Die kleine Klammer strafft die Vene zur besseren Sichtbarkeit.

2.7.3 His-Bündel-EKG-Messung

Sobald der Oktapolarkatheter die richtige Position erreicht hatte, wurden durch Umstecken der acht Elektroden (also paarweise e1e2, e2e3, e3e4, e4e5, e5e6, e6e7 und e7e8) sieben, jeweils über wenige Sekunden dauernde, unterschiedliche intrakardiale Signale aufgezeichnet. Diese sahen wir nach Versuchsende auf Vorhandensein einer

sichtbaren His-Bündel-Erregung durch. In der Regel war sie am deutlichsten bei Aufnahmen zu sehen, bei denen die Amplitude der Vorhoferregung nahezu gleich hoch war, wie die der Kammer.

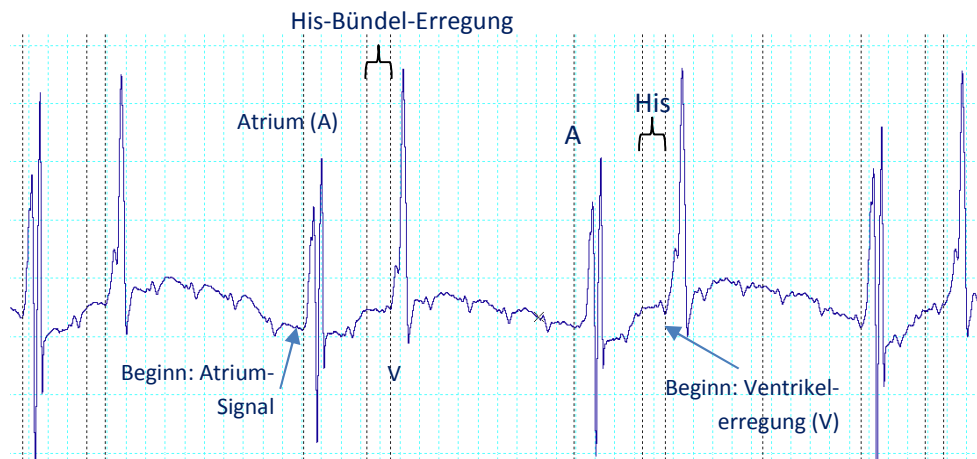


Abbildung 2.6: His-Bündel-Messung bei einer Pannexin-1^{+/+}-Maus.
Sensing (Signalaufzeichnung) mit e3e4

Am besten war das His-Bündel dann zu erkennen, wenn bei der intrakardialen Ableitung die Amplituden der Vorhof- und Kammererregung ähnlich hoch waren.

War eine His-Bündel-Erregung gefunden, wurden pro Maus sechs aufeinanderfolgende Herzschläge bezüglich AH- (Beginn der Vorhoferregung bis zum His-Bündel), HV- (His-Bündel bis Beginn der Kammererregung) und AV-Intervall (Beginn der Vorhof- bis Beginn der Kammererregung) ausgemessen. Dies führten wir bei jeweils sechs Pannexin-1- und fünf TASK-1-Mäusen beider Genotypen durch. Die Mittelwerte pro Tier wurden statistisch ausgewertet.

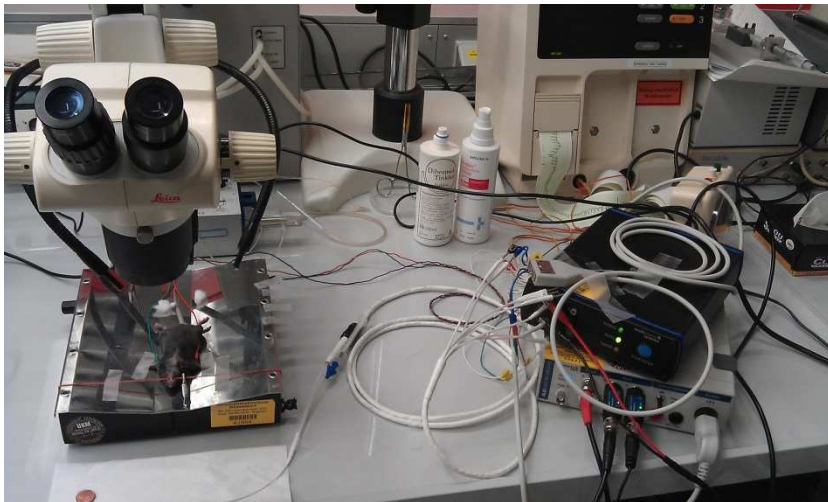


Abbildung 2.7:
Versuchsaufbau bei der
EPU

Das Versuchstier befindet sich während der gesamten OP- und EPU-Dauer auf dem Wärmetisch. EKG-Elektroden zeichnen die Herzaktion auf. Über dem Wärmetisch ist das für die Präparation nötige Binokular zu sehen. Rechts im Bild befinden sich das Powerlab (unten) und der externe Stimulator (oben), sowie das Bioamp. Der Oktapolar-katheter (weißes Kabel mittig) ist einsatzbereit.

2.7.4 Ermittlung der Reizschwelle

Die Reizschwelle wurde für jede Maus zu Beginn der Vorhofstimulation neu ermittelt, da sie sowohl von der Herzgröße und –Lage als auch von der Katheterposition abhängig war. Definiert wurde die Reizschwelle als die minimale Stimulationsamplitude, die zum Auslösen einer Reizantwort im Bereich des Vorhofs bzw. des Ventrikels ausreichte. Dabei genügte es, wenn 50% von 8-10 programmierten Schlägen angenommen wurden, da wir in der Folge immer mit doppelter Reizschwelle (Schrinkel et al., 2007; Berul 2003) stimulierten. Die Stimulationsdauer lag dabei zwischen 1 und 2 ms (Saba et al., 2005).

2.7.5 Vorhofstimulation

Anschließend wurde der rechte Vorhof nach Protokoll mit dem Elektrodenpaar e8 und e7 stimuliert, während die intrakardiale Ableitung mit e5 und e6 stattfand. Der Stimulusimpuls war rechteckig und wurde von einem externen Stimulator (ADInstruments, Spechbach) generiert. Aufzeichnung und Analyse der Daten erfolgte analog zu Punkt 2.7.

Für die **Sinusknotenerholungszeit/Sinus Node Recovery Time (SNRT)** wurde der Vorhof im Abstand von 100ms (teilweise zusätzlich bei 120 und 80ms) 30 Mal hintereinander stimuliert und anschließend die Zeit gemessen, die zwischen dem letztem stimulierten Vorhof und dem ersten spontanen Auftreten eines Vorhofs vergangen war. Dabei wurde im intrakardialen EKG manuell von P-Spitze zu P-Spitze gemessen. Die Stimulation wurde nach gleichem Schema wiederholt und der Mittelwert aus beiden Messergebnissen gebildet.

Die **frequenzkorrigierte SNRTc** ($SNRTc = SNRT - CL$) berechneten wir, indem wir die Zykluslänge (gemittelt aus den fünf unmittelbar vor den 30 stimulierten Sinusschlägen) von der SNRT abzogen. Der Quotient aus SNRT/CL wurde in Prozent % angegeben.

Der **Wenckebachpunkt (WBP)** wurde definiert als der Punkt, bei dem gerade keine 1:1 Überleitung vom Vorhof auf die Kammer mehr erfolgte, sondern eine Blockade im AV-Knoten auftrat. Dies bedeutet, dass bei einer Stimulation von acht Vorhofimpulsen mindestens ein Vorhof keine Kammerreaktion nach sich zog und stattdessen die nächste Erregung wieder ein stimulierter Vorhofimpuls war. Zur Ermittlung des WBPs wurde der Vorhof acht Mal mit immer höheren Frequenzen stimuliert, bis der WBP eintrat. Diese Zeit bestimmte den WBP. Begonnen wurde dabei jeweils mit einer Frequenz, die 20% über der spontanen Herzfrequenz lag und jeweils um 2-5ms verkürzt wurde, bis sich nur noch jeder zweite Stimulus überleiten ließ.

Für die Ermittlung der **AV-Knoten-Refraktärzeit/ atrioventricular nodal refractory period (AVNRP)** wurde der Vorhof acht Mal mit einer vorgegebenen Zykluslänge von 120, 110 und 100 ms stimuliert und ein 9. Stimulus wurde schrittweise verkürzt, bis keine Überleitung des letzten Vorhofstimulus auf eine Kammer mehr erfolgte. Dieser Punkt wurde als AVNRP notiert.

Sodann wurde die **atriale Refraktärzeit/ atrial refractory period (ARP)** gemessen. Sie folgt dem zuletzt genannten Protokoll und beschreibt den Punkt, in dem der 9. Stimulus so weit verkürzt wird, dass er in die atriale Refraktärperiode fällt, das heißt der Stimulus löst keinerlei Vorhofreaktion mehr aus.

Das Ende der Vorhofstimulation bildete die **Burststimulation**, durch die Rhythmusstörungen wie Vorhofflimmern induziert werden sollten (vergl. Kreuzberg et al., 2006; Schrickel et al., 2007). Hierzu wurde der Vorhof 5s lang mit Abständen von 50ms,

40ms, 30ms, 20ms und 10ms hochfrequent stimuliert. Jeder Burst wurde mindestens 1 Mal wiederholt, allerdings erst nach einer Erholungsphase von 10s (Schricket et al., 2007). Sollten während der Aufzeichnung Rhythmusstörungen erkannt werden, wurde versucht, diese unter gleichen Bedingungen zu reproduzieren.

2.7.6 Kammerstimulation

War die Katheteruntersuchung im Vorhof abgeschlossen, wurde das Signal der ventrikulär liegenden Elektroden e1 und e2 überprüft. Für die Ableitung des intrakardialen Signals nutzten wir meist weiterhin das Elektrodenpaar e5 und e6, so dass eine gleichzeitige Beurteilung des Kammer- und Vorhofsignals möglich war. Den Beginn der Kammerstimulation markierte erneut die Ermittlung der Reizschwelle, die nach gleichem Schema ablief, wie beim Vorhof.

Für die **ventrikuläre Refraktärperiode (VRP)/ventricular refractory period** wurde acht Mal in Folge ein Kammerstimulus ausgelöst und ein 9. Stimulus so weit verkürzt, bis keine Kammerreaktion mehr erfolgte. Dieser Punkt, bei dem gerade keine Reaktion mehr auslösbar war, wurde als VRP notiert.

Der **ventrikuläre Burst** erfolgte nach gleichem Schema wie der atriale Burst; auch hier war das Ziel, Tachykardien zu induzieren.

2.7.7 Burststimulation nach Isoprenalininjektion

Dazu wurde den mit Avertin® narkotisierten Versuchstieren zum Ende der EPU Isoprenalin (Alupent®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein), ein β 1-Sympathomimetikum, in einer Dosierung von 2mg/kg Körpergewicht (vergl. Fabritz et al., 2010) intraperitoneal gespritzt. Es wirkt ähnlich wie Adrenalin und führt bereits zwei bis fünf Minuten nach der Injektion zu einem maximalen Herzfrequenzanstieg. Sollte es fünf Minuten nach der Injektion nicht zu einem Anstieg um mindestens 20% gekommen sein, oder die Zykluslänge noch 100ms überschreiten, wurden zusätzlich 0,5mg/kg des Medikaments nachgegeben.

Von elektrophysiologischen Untersuchungen beim Menschen weiß man, dass Isoprenalin zu einer Verlängerung der frequenzkorrigierten QT-Zeit bei Patienten mit LQTS1 führt (Shimizu et al., 1991). Unser Ziel war es deshalb, die ventrikuläre Vulnerabilität der beiden Mausstämmen und die Veränderung des QTc-Intervalls vor der Stimulation und unter dem Einfluss von Isoprenalin zu vergleichen.

Fünf Minuten nach Injektion des Isoprenalins wurde folglich erneut das Burstprotokoll durchgeführt. Die gesamte EPU dauerte von Narkoseeinleitung bis Untersuchungsende etwa $3\text{h} \pm 30\text{ Minuten}$. Nach Abschluss des Experimentes wurden die in Narkose liegenden Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

2.7.8 Auswertung der EPU

Die gesamten Aufzeichnungen wurden im Anschluss nach Rhythmusstörungen durchgesehen, wobei das besondere Augenmerk auf unmittelbar den Stimulationen folgenden Sequenzen lag. Die QT- und QTc-Intervalle wurden direkt vor und unmittelbar nach Isoprenalin-Gabe analysiert, um den Einfluss der adrenergen Stimulation auf diese Parameter zu vergleichen. Eventuelle atriale oder ventrikuläre Flimmersequenzen wurden ausgemessen und ihre Anzahl bei beiden Genotypen verglichen. Auffälligkeiten wie ventrikuläre Extrasystolen (VES), Couplets, Triplets und AV-Dissoziationen notierten wir ebenfalls. Vorhofflimmern wurde definiert als über 1s andauerndes schnelles und unharmonisches Vorhofsignal mit unregelmäßiger AV-Knoten-Überleitung (Schröckel et al., 2007; Kreuzberg et al., 2006). Als Couplets bezeichneten wir zwei aufeinander folgende ventrikuläre Extrasystolen, bei Triplets waren es drei. Zu den ventrikulären Tachykardien wurden vier oder mehr ventrikuläre Schläge außerhalb des normalen Sinusrhythmus gezählt. Sollte während der ventrikulären Stimulation eine retrograde VA-Leitung detektiert werden, wurde dies in der Auswertung protokolliert (Berul et al., 1998).

2.8 Telemetrische Untersuchungen an Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

2.8.1 Grundlagen

Bei Mäusen ist das Ableiten von Langzeit-EKGs nur durch subcutan oder intraperitoneal platzierte Transmitter möglich. Sie stellen eine gute Möglichkeit dar, die schwierig zu erhaltenen Ruheherzfrequenzen bei der Maus ohne den Einfluss von Narkotika zu erreichen (Bernstein, 2003; Berul 2003). Dabei werden EKG-Signale von zwei Elektroden aufgenommen, an Receiverplatten weitergeleitet, von einer Matrix gefiltert (beide DSI Data Sciences, Minneapolis, USA) und schließlich vom Computerprogramm (LabChart 7) sichtbar gemacht.

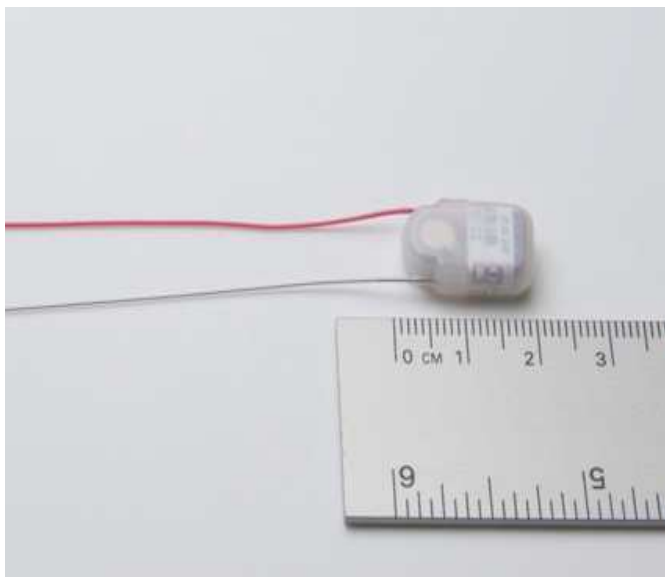


Abbildung 2.8: Unsere Telemetrietransmitter

Die von uns subcutan implantierten Transmitter (Modell ETA-F10 der Firma DSI).¹

Für die subcutane Implantation der etwa 1,6 g schweren Transmitter (DSI Data Sciences, Minneapolis, USA) wurden gleichermaßen männliche und weibliche Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse im Alter von 3-6 Monaten mit einem Gewicht von mindestens 23 g herangezogen. Wie bei Nagern üblich, hatten alle Tiere bis zur Narkoseeinleitung freien Zugang zu Futter und Wasser.

¹ [http://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-\(miniature\)/eta-f10](http://www.datasci.com/products/implantable-telemetry/mouse-(miniature)/eta-f10)

2.8.2 Vorbereitungen für die Transmitterimplantation

Sobald die Tiere nach intraperitonealer Injektion von Ketamin und Xylazin das Narkosetoleranzstadium erreicht hatten, fixierten wir sie in Rückenlage auf einer körperwarmen Wärmeplatte (HAT 007, Minitüb GmbH, Tiefenbach). Ihre Gliedmaßen wurden mit Klebestreifen auf letzterer befestigt, während wir die Augen mit handelsüblichen Augensalben (z. Bsp. HYLO®-Gel, Ursapharm, Saarbrücken) zum Schutz vor Austrocknung behandelten. Über eine Gasmaskе aus Latex wurden die Versuchstiere während der gesamten Operationsdauer mit 0,5 l/min Sauerstoff (Linde AG, Pullach) und 1,5 Vol% Isofluran (Isofluran Actavis, Actavis, München) versorgt. Dabei befanden sie sich auf einer Plexiglasabsaugvorrichtung, die speziell für diese Zwecke angefertigt worden war und die das Austreten von isofluranhaltiger Atemluft verhindern sollte.

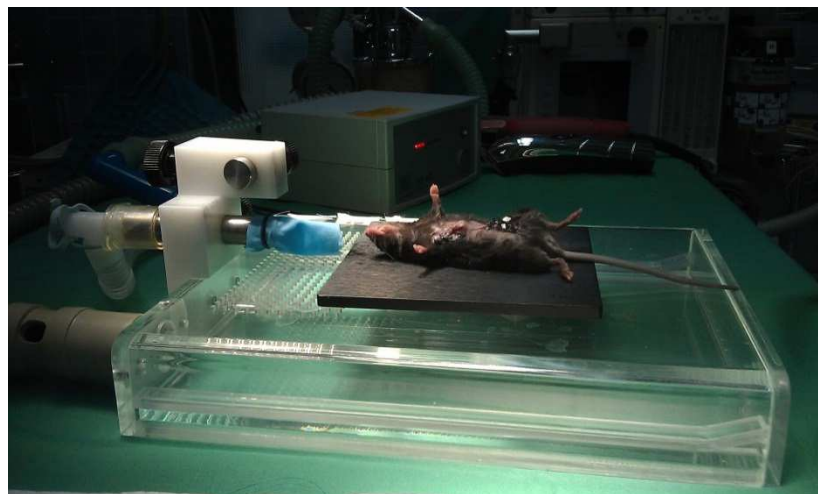


Abbildung 2.9: Maus auf dem OP-Tisch

*Eine Maus auf der Plexiglasabsaugvorrichtung und der Wärmematte.
Das blaue Stück Latex diente als Gasmaskе.*

Während dieser Vorbereitungen wurden der sterile Transmitter und eine 1ml-Mischsspritze aus 5%iger Glukose und physiologischer Kochsalzlösung im Wasserbad vorgewärmt.

2.8.3 Transmitterimplantation

Das Mäusefell wurde nun im Bereich der Achseln, des Thorax' und des Abdomens mit einem herkömmlichen Nassrasierer entfernt und die Haut mehrfach mit einem Desinfektionsspray (Kodan®, Firma Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert. Ein 2 cm langer Hautschnitt wurde rechts paramedian gesetzt. Anschließend wurde mittels stumpfer Präparation beidseits des Schnittes die Haut von der Muskulatur getrennt, bis auf einer Seite eine ungefähr 2x1,5 cm große Tasche entstanden war, in die der erwärmte Transmitter gelegt wurde. Für die beiden Elektroden wurde mittels stumpfer Sonde jeweils ein schmaler subcutaner Gang bis zur rechten beziehungsweise linken Achsel geweitet, durch den sie nach Eröffnung einer kleinen Austrittsstelle in der Haut geführt wurden. Die zwei Elektroden kürzten wir dann jeweils auf die richtige Länge und befestigten auf beiden Drahtenden etwa 0,4cm lange Plastikköppchen mit Hilfe eines Fadens (Prolene®, USP 5-0, Ethicon, Norderstedt). Diese sollten das umliegende Gewebe vor Schädigung durch die spitzen Drahtenden schützen. Proximal des Köppchens wurde der Draht auf einer Länge von 0,5cm ohne Plastikisolierung belassen, was die Ableitungsstelle markierte. Die Elektroden wurden nun auf Höhe der Plastikköppchen mit einem Knopfheft am Brustmuskel fixiert und die darüber liegende Haut mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl®, USP 6-0, Ethicon, Norderstedt) geschlossen. Eine genaue Elektrodenpositionierung war ausschlaggebend für die spätere korrekte und störungsfreie EKG-Ableitung II. Die den Transmitter beinhaltende Tasche wurde nun mit dem gleichen Faden mittels Intrakutannaht und Einzelheften verschlossen. Da sich der alleinige Hautverschluss durch Nahtmaterial als nicht ausreichend sicher herausstellte, wurden dem Wundkamm zusätzlich 3-4 Michel-Wundklammern (7,5 x 1,75 mm, Tierärztebedarf J. Lehnecke, Schortens) aufgesetzt.

Während der Operation wurden die Tiere zum Flüssigkeits- und Energieausgleich mit der vorgewärmten Mischspritze aus 5%-Glukose (Braun Melsungen GmbH, Melsungen) und physiologischer Kochsalzlösung (Braun Melsungen GmbH, Melsungen) durch intraperitoneale Injektion versorgt und bekamen Carprofen (5 mg/kg) als Schmerzmittel (Rimadyl®, Pfizer, Berlin) subcutan gespritzt. Zum Schluss besprühten wir die Hautnähte der frisch operierten Mäuse mit Silberspray und stellten sie mitsamt ihrer Käfige während

der Aufwachphase für 1-2h in einen auf 35°C aufgeheizten Wärmeschrank, wo sie permanent überwacht wurden.



Abbildung 2.10: Frisch operierte Maus

Der Transmitter ist als kleine Vorwölbung links der Bauchklammern zu erkennen.

2.8.4 Postoperative Nachsorge

In den ersten 7 Tagen nach der Transmitterimplantation stellten wir den Mäusen neben Futter auf dem Käfigboden auch Wasserflaschen mit bodennah reichenden Nippeln zur Verfügung, die die Tiere trotz anfänglicher Schwierigkeiten beim Aufrichten jederzeit gut erreichen konnten. Bis zur Klammerentfernung wurden sie in Einzelkäfigen gehalten, um ein gegenseitiges Öffnen der Wunden zu vermeiden.

Die postoperative Versorgung fand durch tägliche Wund- und Gewichtskontrollen, Allgemeinuntersuchungen soweit möglich und die subkutane Applikation von 5mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer, Berlin) über vier Tage statt. Wenn nötig, erhielten die Tiere in den ersten beiden Tagen 1ml körperwarme NaCl/Glukosemischung (50/50 per os oder i.p.). In den ersten drei Tagen post operationem wurde ein Gewichtsverlust von bis zu 10 % bei ungestörtem Allgemeinbefinden geduldet. Verloren einzelne Tiere mehr Gewicht, oder zeigten sie ein schlechtes Allgemeinbefinden, wurden sie aus ethischen Gründen gemäß der Kriterien unseres Tierversuchsantrags durch cervikale Dislokation getötet.

Ab dem 4. Tag sollte sich eine stetige Gewichtszunahme bis mindestens zum Ausgangsgewicht einstellen. Zehn Tage nach Transmitterimplantation wurden die verbliebenen Klammern ohne Sedation entfernt. Zu diesem Zeitpunkt konnten gleichgeschlechtliche Mäuse wieder vergesellschaftet werden.

Bei Abschluss der Untersuchungen wurden die Mäuse getötet, die Telemetrietransmitter entfernt und mittels der Lösungen Gigazyme® und Gigasept® (Firma Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) gesäubert und desinfiziert.

2.8.5 Aufzeichnung der Langzeit-EKGs

Analog zu Kramer et al. (1998) begannen wir zehn Tage nach der Transmitterimplantation mit der Aufnahme der 24-Stunden-EKGs. Um keine Irritationen oder Verhaltensänderungen auszulösen, verblieben die Tiere während der Aufzeichnung in Einzelkäfigen. An Tagen der EKG-Aufnahme wurde darauf geachtet, außergewöhnliche Belastungen durch Personen und Geräusche im Tierraum zu vermeiden, damit der inverse Tag-Nacht Rhythmus nicht gestört wurde.

Alle für die EKG-Ableitung nötigen Geräte wie Powerlab, PC, Monitor, Ableiteplatten, Box und diverse Stromkabel wurden vor Verbringen in den jeweiligen Tierraum gründlich desinfiziert (Incidin® Liquid, Ecolab, Monheim). Aufgenommen wurden die Daten mit der LabChart 7-Software (ADInstruments, Spechbach) und einer Samplingrate von 1kHz.

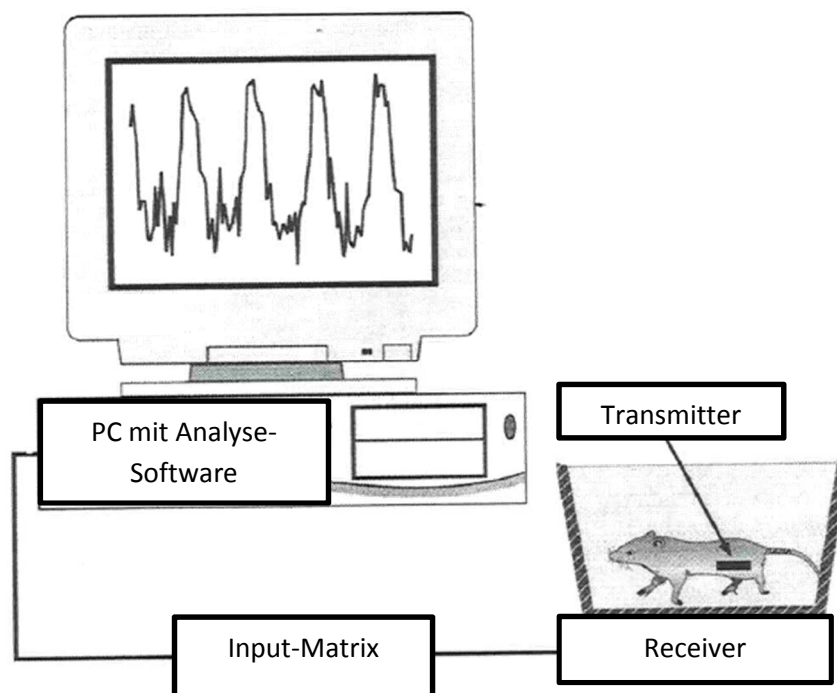


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der Langzeit-EKG-Aufzeichnung

Modifiziert nach Kramer, 2000

2.8.6 Analyse der Langzeit-EKGs

Zur Auswertung der Langzeit-EKGs wurde die LabChart 7 Software (ADInstruments, Spechbach) verwendet. Die Aufnahmen wurden dazu hinsichtlich Herzrhythmusstörungen von zwei unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis des Genotypen durchgesehen. Nach Ausschluss von Artefakten wurde die minimale, maximale und durchschnittliche Herzfrequenz ermittelt. Die Ruhephase der Mäuse im 24-Stunden-EKG, also die Aufnahmen von 7 Uhr morgens bis 19 Uhr abends, wurde anschließend so geschnitten, dass alle 20 Minuten bei mindestens 5 Einzelschlägen EKG-Zeiten und –Intervalle analog zum bereits erwähnten Oberflächen-EKG analysiert werden konnten, insgesamt also etwa 300 Schläge pro Maus. Die Tagphase wurde deswegen ausgewählt, weil Bewegungsartefakte in der physiologischen Ruhephase der Tiere deutlich seltener waren. Die Berechnung des frequenzkorrigierten QTc-Intervalls erfolgte zunächst nach der Formel von Mitchell (Mitchell et al., 1998). Zum Vergleich bedienten wir uns zusätzlich allerdings auch einer anderen Formel nach Framingham, die von Sagie et al. 1992 publiziert wurde.

2.8.7 Belastungsuntersuchungen bei Pannexin-1^{-/-} und Pannexin-1^{+/+}-Mäusen

Zur Evaluation der Herzfrequenzen und Detektion möglicher belastungsabhängiger Herzrhythmusstörungen sollen Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse bei Schwimm- und Laufbandversuchen unter Aufzeichnung ihres EKGs an ihre körperliche Belastungsgrenze gebracht und gleichzeitig psychischem Stress ausgesetzt werden. Solche Belastungsversuche wurden bisher bei Pannexin-1-defizienten Mäusen nicht vorgenommen.

Gerade weil es sich bei Pannexin-1 um einen Kanal handelt, der am Herzen unter anderem für die Passage von ATP zuständig ist, wäre es von Vorteil zu wissen, ob sein Fehlen in Ruhe und/oder unter körperlicher Belastung Auswirkungen auf die Herzphysiologie hat.

2.8.7.1 Schwimmen

Schwimmversuche (SV) gelten in der Versuchstiermedizin als Bewegung mit konstanter Auslastung, die zu einer submaximalen Belastung führt (Bernstein et al., 2003).

Nach telemetrischer Aufzeichnung eines Ruhe-EKGs über fünf Minuten, schwammen die Tiere einzeln weitere fünf Minuten lang in einem Makrolonkäfig der Größe II (15cm hoch mit 37-39°C warmem Leitungswasser gefüllt). Kam es bei einzelnen Tieren zu einem erschöpfungsbedingten Abtauchen, wurden sie kurzzeitig manuell unterstützt. Während des Schwimmens und in der 10-minütigen Nachbelastungsphase, die die Mäuse wieder in ihren Käfigen verbrachten, wurde das EKG aufgezeichnet.



Abbildung 2.12: Maus beim Schwimmen mit manueller Unterstützung

Für die Auswertung unterteilten wir den Schwimmversuch wie folgt in drei Phasen:

Tabelle 1: Zeitliche Einteilung des Schwimmversuches

Phase	Zeitdauer (min)	Aktivität
1	0 bis 5	Ruhe
2	5 bis 10	Schwimmen
3	10 bis 20	Erholung

2.8.7.2 Laufbandergometrie

Körperliche Belastung mittels Laufbandarbeit zu erreichen, gilt als Goldstandard, um bei Menschen oder anderen großen Säugetieren einen kontrollierten kardiovaskulären Stress

zu verursachen (Bernstein et al., 2003). So fand die zweite Form der Belastungsuntersuchung frühestens 2 Tage nach Aufzeichnung der Schwimmversuche statt, um den Mäusen eine Regenerationsszeit zu gewähren. Für die Laufbanduntersuchung wurden 2 Mäuse nebeneinander in jeweils eine der 4 Bahnen des Laufbands (Simplex II Metabolic Modular Treadmill, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA) gesetzt. Dort konnten sie sich 5 Minuten lang mit dem stehenden Laufband (LB) und seinen Gerüchen und Geräuschen vertraut machen, wobei bereits das EKG aufgezeichnet wurde. Während dieser Eingewöhnungszeit war der Stromimpuls aktiviert, der den Tieren bei Berührung der Spule einen leichten Stromschlag verpasste. Dadurch sollten sie schon beim unbewegten Laufband lernen, auf dem Band zu bleiben.



Abbildung 2.13: Das Laufband in gerader Position
Jeweils die beiden äußeren Spuren wurden zur EKG-Ableitung genutzt.

Als Indikation für die Beendigung der Laufbandergometrie galt die Erschöpfung der Mäuse. Sie wurde definiert als über 5s dauerndes Verbleiben der Tiere auf der Stromspule, oder wiederholtes Zurückfallen darauf, ohne je die Mitte des Laufbandes wieder zu erreichen (vergl. Desai et al., 1999; Massett und Berk, 2005; Niebauer et al., 1999). Da immer die gleiche Person die Laufbandversuche durchführte und von Beginn bis Ende anwesend war, sollte die Ermüdung jeweils gleich gedeutet worden sein.

Wir entschieden uns dafür, zwei verschiedene Laufbandprotokolle zu vergleichen. In der Literatur werden unterschiedliche Protokolle genannt, die alle eine stetige Erhöhung der

Laufgeschwindigkeit mit oder ohne Steigung beeinhalteten und mit der Erschöpfung der Tiere endeten (Desai et al., 1999; Kemi et al., 2002; Massett und Berk, 2005; Niebauer et al., 1999).

Unser erstes Laufbandprotokoll I ohne Steigung (siehe Tab. 2) beschränkte sich auf eine gerade Laufstrecke, bei der die Geschwindigkeit bis Eintreten der Ermüdung stetig erhöht wurde.

Tabelle 2: Laufbandprotokoll I ohne Steigung

Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)	Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)
0	2	20	13
2	3	22	14
4	5	24	15
6	6	26	16
8	7	28	17
10	8	30	18
12	9	32	19
14	10	34	20
16	11	36	21
18	12	38	22

Das zweite Laufbandprotokoll II mit Steigung wurde frühestens 2 Tage nach dem ersten durchgeführt, um den Tieren eine Regenerationsszeit zu gewähren. Zusätzlich zur stetigen Geschwindigkeitserhöhung wurden alle vier Minuten Steigungen in 5°- Schritten von 0° bis 25° eingeführt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Laufbandprotokoll II mit Steigung

Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)	Rampeneinstellung (Grad)	Zeit (min)	Geschwindigkeit (m/min)	Rampeneinstellung (Grad)
0	2	0	16	10,2	20
2	3	"	18	11,4	"
4	3,3	5	20	12,5	25
6	4,5	"	22	13,7	"
8	5,6	10	24	14,8	"
10	6,8	"	26	15,9	"
12	7,9	15	28	16,5	"
14	9,1	"	30	17,7	"

Unmittelbar nach Erschöpfungseintritt wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und während der 10-minütigen Erholungsphase wurde ihr EKG weiter aufgezeichnet. Für jede Maus wurden die zurückgelegte Distanz sowie die Geschwindigkeit zum Zeitpunkt der Ermüdung notiert. Die Erholungsphase fand immer unter Beobachtung statt und eventuelle Auffälligkeiten wurden notiert.



Abbildung 2.14: Eine Maus auf dem geraden Laufband

Waren beide Laufbandprotokolle und die dazugehörigen Erholungsphasen überstanden, wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Sie dienten im Anschluss der Ermittlung von Körperparametern.

Wie der Schwimmversuch wurden auch die Laufbandversuche zur Auswertung in drei verschiedene Abschnitte unterteilt:

Tabelle 4: Zeitlicher Ablauf beider Laufbandversuche

Phase	Zeitdauer (min)	Aktivität
1	0 bis 5	Ruhe
2	5 bis 10	Laufband
3	10 bis 20	Erholung

2.8.7.3 Analyse der Belastungsuntersuchungen

Die Auswertung der verschiedenen Belastungsuntersuchungen verlief analog zur Analyse der Langzeit-EKGs, zusätzlich wurde die Leistungsfähigkeit beider Genotypen verglichen. Für minimale und maximale Herzfrequenzen wurden jeweils die langsamsten bzw. schnellsten zehn Herzschläge gemittelt.

2.9 Herzultraschalluntersuchung bei Pannexin-1^{-/-} - und Pannexin-1^{+/+} -Mäusen

2.9.1 Grundlagen

Der Herzultraschall stellt eine schnelle, nicht invasive und visuelle Methode der Herzuntersuchung *in vivo* dar. Mit seiner Hilfe können anatomische Strukturen, Größenverhältnisse und Klappenveränderungen unter EKG-Kontrolle beurteilt und viele Informationen über die kardiale Funktion gewonnen werden.

Das Ultraschallgerät sendet dabei hochfrequente pulsierende Schallwellen aus, die von verschiedenen Körpergeweben reflektiert oder absorbiert werden. Durch Bezug auf die Entfernung zum Schallkopf können so Dicke, Größe und Lokalisation unterschiedlicher Weichteilgewebe bestimmt werden (Nelson und Couto, 2006). Für unsere Untersuchungen wurden **2-D- und M-Mode**- Schnittbilder des Herzens anfertigt. Diese dienten neben der Beurteilung der systolischen Ventrikelfunktionen, Wanddicken und Klappenfunktionen vor allen Dingen auch dem Ausmessen verschiedener Strukturen. Wir bestimmten im **B-Mode** beispielsweise die Herzlänge und den inneren Herzumfang in verschiedenen Ebenen und Herzaktionen für die anschließende Berechnung der Volumetrie nach Simpson. Die zweite Einstellung, der **M-Mode**, erzeugt eindimensionale Bilder der Herzstrukturen. Die im Verlauf des Herzzyklus aufgezeichneten Echos werden auf dem Bildschirm gegen die Zeit abgebildet, wodurch kardiale Grenzen besonders gut sichtbar gemacht werden. In dieser Einstellung wurden Kammerdurchmesser und Bewegungsabläufe, die die Grundlage der systolischen Funktionsmessung (SF– *Shortening fraction*) sind, bestimmt (Nelson und Couto, 2006).

Dank hoher Bildraten und einer guten Ortsauflösung sind mittlerweile auch echokardiographische Untersuchungen am kleinen Mäuseherzen mit seiner hohen Herzfrequenz möglich.

Die Echokardiographie erfolgte mit dem *Vevo 2100* (FUJIFILM Visual Sonics Inc., Toronto, Canada) und einem MS 400 Linearschallkopf von 18-38 MHz. Pro Messwert wurden bei 14 Pannexin-1^{+/+} - und 12 Pannexin-1-defizienten Mäusen jeweils 10 Herzschläge gemittelt.



Abbildung 2.15: Das von uns genutzte Ultraschallgerät²

Alle Mäuse wurden frühestens zwölf Tage nach der Transmitterimplantation echokardiographisch untersucht.

2.9.2 Durchführung der Echokardiographie

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 5% Isofluran (Isofluran Actavis®, Actavis, München) und 0,5 l/min Sauerstoff (Linde AG, Pullach) und wurde auf 1,5% Isofluran bei gleichbleibendem Sauerstofffluss reduziert, um den Einfluss des Narkosegases auf das Herzkreislaufsystem möglichst gering zu halten. Die Tiere sollten lediglich unbeweglich sein. Zur Untersuchung wurden die Mäuse in Rückenlage auf die körperwarm vorgeheizte Wärmeplatte des VevoSystems, die gleichzeitig ein verschiebbares Tischchen darstellte,

² www.visualsonics.com/vevo2100

gelegt. Dazu wurden ihre Pfoten mit Klebestreifen auf den Sensoren zur EKG-Ableitung fixiert, ihr Kopf in die Gasmaskе gelegt und die Körpertemperatur mittels eines rektalen Sensors überwacht. Um die Ultraschallbilder möglichst artefaktfrei zu halten, rasierten wir unsere Mäuse im Brustbereich (Contura, Wella, Darmstadt).



Abbildung 2.16: Maus während der Echokardiographie

Das Versuchstier liegt während der Echokardiographie auf einem Wärmetisch und erhält Narkosegas (Isofluran) über eine Maske. Zur Überwachung sind seine Gliedmaßen mit Klebestreifen auf EKG-Sensoren fixiert und ein rektaler Sensor (blau) zeichnet die Körpertemperatur auf.

Zur besseren Übersicht wählten wir als erste Aufnahme die parasternale lange Achse. In dieser Einstellung wurden der Aortenfluss, der Durchmesser des Aortenklappenrings, die Herzlänge und ein M-Mode für die Wandstärkenmessung aufgenommen.

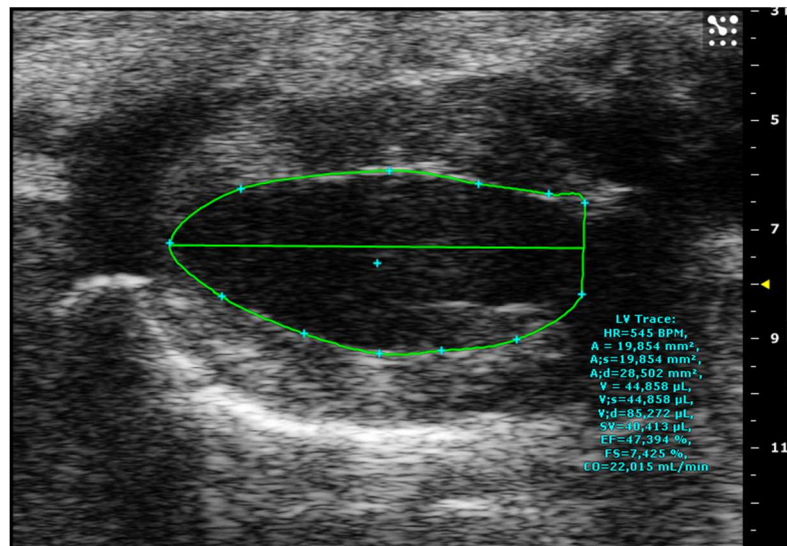


Abbildung 2.17: Messung der diastolischen Herzlänge und des inneren Herzumfanges in der parasternalen langen Achse

Grün: Manuelle Umrundung des Endokards und Messung der Herzlänge in der Diastole

Zudem nutzten wir diese Einstellung zur Berechnung der linksventrikulären Herzmasse nach der Flächen-Längen-Methode, welche beim Menschen und der Maus zu besten Ergebnissen führt (Collins et al., 2001; Devereux et al., 1986). Dabei wird die Länge des linken Ventrikels von der endokardialen Herzspitze bis zum mitralen Annulus gemessen und ein M-Mode auf Papillarmuskelebene angefertigt (Collins et al., 2001).

Bei der folgenden zweiten Einstellung, der kurzen Achse, speicherten wir 3 verschiedene B-Mode Schnittebenen in Bereichen der Herzspitze, -Mitte und -Basis. Dazu wurde das Endokard aller drei Schnittebenen in der Systole und Diastole manuell umrundet.

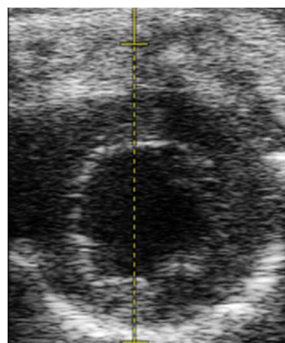


Abbildung 2.18: Kurze Achse im B-Mode (linker Ventrikel)

Schwarz mittig=Herzlumen, drumherum hellgrau= Endokard, dunkelgrau= Myokard

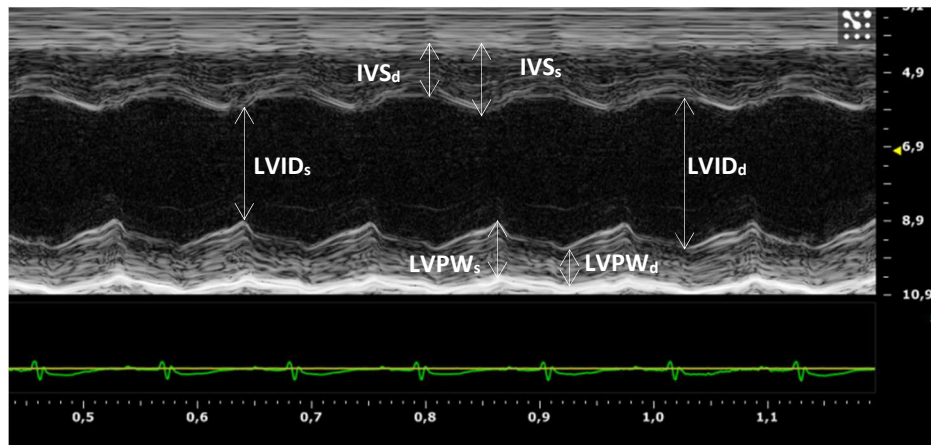


Abbildung 2.19: Messung der Wanddicken (jeweils in der Diastole und in der Systole) in der kurzen Achse im M-Mode

Zusammen aus diesen Daten und den Längenmessungen der ersten Einstellung wurde die Volumetrie nach Simpson berechnet. Zusätzlich wurde auf Höhe der Herzmitte ein M-Mode gespeichert, mit dem die Messung der Wand- und Septumdicke möglich war.

Im anschließenden 4-Kammerblick ließen sich die Flusshöhen über Mitralklappe und Aorta beurteilen. Nach Beendigung der Aufnahmen wurden Narkosegas- und Sauerstoffzufuhr geschlossen, die Tiere vom Ultraschallgel befreit und zurück in ihre Käfige gesetzt.

Bei jeder Einstellung speicherten wir neben Aufnahmen der Herzaktion im Video auch Einzelbilder. Bei der Beurteilung der Schallbefunde wurde auf strukturelle Veränderungen wie Muskelhypertrophien, sowie Ventrikel- und Vorhofausmaße geachtet. Da während der gesamten Messung ein EKG aufgezeichnet wurde, konnten gleichzeitig auch Rhythmusstörungen erkannt werden.

2.9.3 Messwerte

Aus Werten, die direkt gemessen werden konnten wie maximale Flussgeschwindigkeit (*AV Peak*) und maximaler Blutdruck über der Aortenklappe (*AV Peak Pressure*), Amplitude der mitralen E-Welle (*MV E*), Septumdicken (*IVS_d* und *IVS_s*), Durchmesser (*LVID_d* und *LVID_s*) sowie Wanddicke des linken Ventrikels (*LVPW_d* und *LVPW_s*), distale, mittige und proximale Flächen des linken Ventrikels in jeweils der Systole und Diastole,

sowie die innere Herzlänge in beiden Herzaktionen, wurden weitere Werte nach folgenden Formeln berechnet (Handbuch des Vevo 2100, Seite 372 ff.):

$$\text{LV Vol d } (\mu\text{l}) = ((7 / (2,4 + \text{LVID}_d)) \times \text{LVID}_d)^3$$

$$\text{LV Vol s } (\mu\text{l}) = ((7 / (2,4 + \text{LVID}_s)) \times \text{LVID}_s)^3$$

$$\text{EF } (\%) = 100 \times ((\text{LV Vol}_d - \text{LV Vol}_s) / \text{LV Vol}_d)$$

$$\text{FS } (\%) = 100 \times ((\text{LVID}_d - \text{LVID}_s) / \text{LVID}_d)$$

$$\text{LV Masse (mg)} = 1,053 \times ((\text{LVID}_d + \text{LVPW}_d + \text{IVS}_d)^3 - \text{LVID}_d^3)$$

(wobei 1,053 mg/mm³ die Dichte des Myokards darstellt)

$$\text{Korrigierte LV Masse (mg)} = \text{LV Masse} \times 0,8$$

$$\text{Simpson Volumen}_d (\mu\text{l}) = (\text{Proximale Fläche}_d + \text{Fläche Mitte}_d) \times h + \text{distale Fläche}_d \times h/2 + \pi/6 \times h^3$$

(h = Simpson Länge_d)

$$\text{Simpson Volumen}_s (\mu\text{l}) = (\text{Proximale Fläche}_s + \text{Fläche Mitte}_s) \times h + \text{distale Fläche}_s \times h/2 + \pi/6 \times h^3$$

(h = Simpson Länge_s)

$$\text{Simpson FAC } (\%) = 100 \times (\text{Simpson Fläche Mitte}_d - \text{Simpson Fläche Mitte}_s) / \text{Simpson Fläche Mitte}_d$$

$$\text{Simpson SV}^* (\mu\text{l}) = \text{Simpson Volumen}_d - \text{Simpson Volumen}_s$$

$$\text{Simpson EF } (\%) = 100 \times \text{Simpson SV}^* / \text{Simpson Volumen}_d$$

$$\text{Simpson CO (ml/min)} = \text{Simpson SV}^* \times \text{HF}$$

2.10 Herzfrequenz-turbulenz/Heart Rate Turbulence (HRT) bei TASK-1^{+/-} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

2.10.1 Grundlagen

Bereits 1979 fielen Doehlemann et al. Variationen der Herzfrequenz nach ventrikulären Extrasystolen (VES) auf. Sie beschrieben kürzere RR-Intervalle nach Extrasystolen, die sich nach ein paar Herzschlägen wieder auf Ausgangswerte normalisierten und nannten die Erscheinung „*ventriculophasic sinus arrhythmia*“ (Doehlemann et al., 1979; Schwab et al., 2004). 1999 wurde das Thema von Schmidt et al. erneut aufgegriffen, die den seither geltenden Begriff der Heart Rate Turbulence (HRT) einführten. Sie definieren die HRT als Variationen der Sinuszykluslänge mit dem charakteristischen Muster einer Herzfrequenzbeschleunigung nach ventrikulären Extrasystolen und einer folgenden

Herzfrequenzverlangsamung bei gesunden Individuen. Mit dem Begriff *Turbulence Onset (TO)* wird die anfängliche kurze Herzfrequenzbeschleunigung beschrieben, *Turbulence Slope (TS)* hingegen ist die maximale positive Steigung, die aus je 5 aufeinanderfolgenden Sinusrhythmus-RR-Intervallen innerhalb der ersten 15 auf die VES folgenden Herzschläge berechnet wird (Bauer et al., 2008).

Die Formel zur Berechnung der TO lautet:

$$TO (\%) = (RR_1 + RR_2) - (RR_{-2} + RR_{-1}) / (RR_{-2} + RR_{-1}) \times 100$$

Hierbei sind RR_{-2} und RR_{-1} die RR-Intervalle, die direkt vor der ventrikulären Extrasystole aufgezeichnet wurden. RR_1 und RR_2 dagegen beschreiben die beiden RR-Intervalle, die direkt auf die ventrikuläre Extrasystole folgen. RR_{3-7} sind folglich die weiteren durchnummerierten RR-Intervalle (Schmidt et al., 1999; Bauer et al., 2008). Damit eine ventrikuläre Extrasystole zur Berechnung der HRT herangezogen werden kann, müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein: Sie sollte um etwa 20% früher auftreten, als die vorherigen Sinusschläge. Zudem ist ein wichtiges Kennzeichen der ventrikulären Extrasystole, dass sie die vorhergehenden Zykluslängen um mindestens 20% übersteigt (Bauer et al., 2008).

Physiologischerweise wird die anfängliche Beschleunigung der Herzfrequenz nach einer vorzeitigen ventrikulären Kontraktion durch ein $TO \leq 0$ und der Herzfrequenzabfall durch ein $TS \geq 2,5$ widerspiegelt (Schmidt et al., 1999). Bauer et al. nennen als Normalwerte ein negatives TO und positives TS.

Ob die VES spontan, durch programmierte ventrikuläre Stimulation wie in unserem Fall, oder durch Schrittmacher entstehen, ist dabei nicht von Bedeutung (Marine et al., 2002; Roach et al., 2002; Havranek et al., 2007; Raj et al., 2005). Allerdings ist allgemein bekannt, dass das HRT-Muster oft durch eine Herzfrequenzvariabilität anderen Ursprungs maskiert ist; deswegen ist für eine genaue Untersuchung eine hohe Anzahl an VES nötig (Bauer et al., 2008).

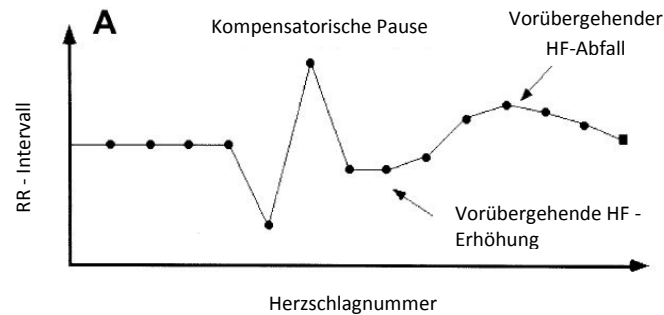


Abbildung 2.20: Physiologische HRT nach einer ventrikulären Extrasystole

Modifiziert nach Marine et al., 2002

2.10.2 Präparation und Katheterimplantation

Um die autonome Regulation des Herzens von TASK-1-defizienten Mäusen näher zu untersuchen, analysierten wir das Muster der HRT bei jeweils 9 WT- und KO-Mäusen in einem Alter von 4-10 Monaten (Petric et al., 2012).

Dazu nutzten wir unser Powerlab 8/30 in Verbindung mit dem Bioamp und dem externen Stimulator (alles ADInstruments, Spechbach). Letzteren stellten wir zusammen mit dem laufenden LabChart-Programm so ein, dass automatisch nach Betätigen seines Auslösers ein Stimulationsimpuls nach der nächsten R-Zacke ausgelöst wurde. Höhe der Impulse und Ankopplungsintervalle nach der R-Zacke legten wir mit dem Computerprogramm fest. Ein EKG wurde gleichzeitig aufgenommen.

Abgesehen davon, dass die Tiere hier mit intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (Narkodorm®, CP-Pharma, Burgdorf; 30mg/kg) in Narkose gelegt wurden und statt des Oktapolarkatheters ein 1F-Bipolarer Katheter genutzt wurde, waren alle Vorbereitungen identisch zur oben beschriebenen Elektrophysiologischen Untersuchung. Die endgültige Katheterposition war gefunden, wenn bei der intrakardialen Ableitung nur das aktive Kammermyokard sichtbar war. Als Reizschwelle definierten wir den Punkt, bei dem die Hälfte von fünf Stimulationsimpulsen eine Myokardaktion auslöste. Für die nachfolgende Stimulation nutzten wir das Zweifache dieser bestimmten Reizschwelle.

2.10.3 Auslösen und Aufnahme von VES

Nach Ermittlung der Reizschwelle bestimmten wir die Herzfrequenz des Versuchstieres und zeichneten jeweils mindestens zehn einzelne ventrikuläre Extrasystolen (VES) mit gleicher Vorzeitigkeit von 70, 60, und 50 ms auf. Zwischen den einzelnen VES lagen jeweils mindestens 10s. Damit die Vorzeitigkeiten genau eingehalten werden konnten, musste der Stimulationsimpuls abhängig von der vorherigen R-Zacke sein. Schon während der Aufzeichnung ließ sich überprüfen, ob die einzelnen Stimuli auch wirklich zu vorzeitigen Ventrikelkontraktionen geführt hatten. Aufgrund der verschiedenen Herzfrequenzen waren allerdings nicht bei allen Mäusen immer die gleichen Vorzeitigkeiten messbar. Während der Präparation und Stimulation fand die Reflexüberprüfung analog zur Avertin®-Narkose in regelmäßigen Abständen statt und gegebenenfalls wurde Pentobarbital (10mg/kg) nachinjiziert. Unmittelbar nach Beendigung der Aufzeichnungen wurden die Versuchstiere aus den gleichen Gründen wie bei der EPU noch in Narkose getötet. Von Beginn der EKG-Aufzeichnung bis Beendigung des Experiments vergingen in der Regel 1,5h.

2.10.4 Analyse

Ausgewertet wurden alle ventrikulären Extrasystolen, die die von Bauer et al. (2008) definierten Bedingungen erfüllten (siehe 2.11.1). Dabei bestimmten wir nicht nur die Herzfrequenzänderung der ersten beiden Schläge nach der VES, sondern untersuchten das TO der ersten 7 Schläge. Alle zu verschiedenen Vorzeitigkeiten berechneten TOs und TS' wurden gemittelt und nach Genotypen getrennt erfasst.

Da wir immer 15 Intervalle nach der VES auswerteten, ergab das 11 Werte, aus denen die TS berechnet wurde:

TS 1=RR1-RR5; **2**=RR2-RR6; **3**=RR3-RR7; **4**=RR4-RR8; **5**=RR5-RR9; **6**=RR6-RR10; **7**= RR7-RR11; **8**=RR8-RR12; **9**=RR9-RR13; **10**=RR10-RR14; **11**=RR11-RR15.

2.11 Statistische Auswertungen

Die Daten aller Versuche werden als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) präsentiert und stammen von einer in jedem Versuch erläuterten Anzahl an Mäusen (n). Je nachdem was für die Fragestellung angebracht war, wurde die statistische Signifikanz mit dem ungepaarten t-Test, dem einfachen ANOVA, oder der linearen Regression berechnet. Bei einem p-Wert von <0.05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden durchgeführt mit dem Programm GraphPadPrism® (La Jolla, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Anthropometrische Daten der Pannexin-1^{-/-} - und Pannexin-1^{+/-} -Mäuse

Bei der Analyse aller anthropometrischen Daten zeigten sich zwischen beiden Genotypen keine Unterschiede. So waren alle Tiere durchschnittlich etwa gleich schwer, hatten ähnlich gewichtige Herzen und unterschieden sich auch in der Länge ihrer Tibiae nicht voneinander. Folglich waren auch alle daraus resultierenden Quotienten nicht statistisch signifikant verschieden (siehe Tabelle 5). Demnach sind die körperlichen Voraussetzungen von Pannexin-1^{+/-} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen vergleichbar und scheinen nicht von der Funktion des Pannexin-1 Proteins beeinflusst zu werden.

Tabelle 5: Anthropometrische Daten der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse

Körperparameter	Pannexin-1 ^{+/-}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
Körpergewicht KG (g)	28,3 ± 3,3	12	29,3 ± 9,0	9	n.s.
Herzgewicht HG (g)	0,21 ± 0,03	7	0,22 ± 0,04	8	n.s.
Tibiallänge TL (mm)	18,0 ± 0,6	9	18,3 ± 0,5	9	n.s.
HG/KG	0,008 ± 0,002	7	0,008 ± 0,002	8	n.s.
HG/TL	0,01 ± 0,001	6	0,01 ± 0,003	8	n.s.
HG in % des KG	0,8 ± 0,2	7	0,8 ± 0,2	8	n.s.

Auch beim Vergleich der Körperparameter von TASK-1^{+/-} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen ergaben sich zwischen beiden Genotypen in der Vergangenheit keine Unterschiede (Donner et al., 2010).

3.2 Histopathologische Untersuchung der Herzen von Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die histopathologische Untersuchung der Herzen von Pannexin-1-defizienten Mäusen und ihren Wildtypwurfgeschwistern zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen (siehe Tabelle 6). Weder Endokard- und interstitielle Fibrosen, noch Hinweise auf Speichersubstanzen wie Lipofuszin waren zu finden. Des Weiteren gab es keine Anzeichen von Entzündungsfiltraten, oder einem zellulären Disarray. Die Herzwanddicken unterschieden sich weder beim linken, noch beim rechten Ventrikel signifikant voneinander. Die Herzmuskelfasern waren bei beiden Genotypen im Durchschnitt gleich lang und auch hinsichtlich der Kernlänge nicht verschieden.

Tabelle 6: Vergleichende Histopathologie an Herzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Histopathologie	Pannexin-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
Dicke rechter Ventrikel (µm)	447,3 ± 60,1	3	475,3 ± 153,9	4	n.s.
Dicke linker Ventrikel (µm)	1789 ± 314	3	1324 ± 197	4	n.s.
Breite Herzmuskelfasern (µm)	18,3 ± 2,1	3	17,0 ± 0,8	4	n.s.
Kernlänge (µm)	27,3 ± 3,2	3	24,5 ± 2,4	4	n.s.

Fasst man die Ergebnisse dieser und der anthropometrischen Untersuchung zusammen, wird ersichtlich, dass eine Pannexin-1-Defizienz bezüglich der untersuchten Parameter zu keinen feststellbaren Unterschieden zwischen Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1-defizienten Mäusen führt.

Histopathologische Untersuchungen der Herzen von TASK-1 WT- und KO- Mäusen ergaben ebenfalls keine statistischen Auffälligkeiten zwischen beiden Genotypen (Donner et al., 2010).

3.3 Oberflächen-EKGs bei Pannexin-1- und TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosen

3.3.1 Isoflurannarkose bei Pannexin-1^{+/+}- und Pannexin-1^{-/-}-Mäusen

Die 7 Pannexin-1-defizienten Tieren wiesen bei der Isoflurannarkose eine signifikant höhere Herzfrequenz und dementsprechend ein kürzeres RR-Intervall auf, als ihre 7 Wildtypwurfgeschwister (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Isoflurannarkose

Isofluran	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR-Intervall(ms)	132 ± 8	120 ± 7	*p = 0,01
HR (bpm)	456 ± 28	501 ± 27	*p = 0,01
P Dauer (ms)	8,4 ± 1,2	9,4 ± 1,5	n.s.
P Amplitude (mV)	0,06 ± 0,02	0,1 ± 0,04	n.s.
PR Intervall (mV)	42 ± 4	39 ± 8	n.s.
QRS Intervall (ms)	8,3 ± 1,5	9,4 ± 1,8	n.s.
R Amplitude (mV)	0,92 ± 0,2	0,98 ± 0,3	n.s.
QT-Intervall (ms)	35 ± 3	45 ± 4	**p = 0,009
QTc-Intervall (ms)	31 ± 3	41 ± 4	**p = 0,005
Anzahl (n)	7	7	

Darüber hinaus war die QT-Zeit und das frequenzkorrigierte QTc-Intervall bei den Pannexin-1^{-/-}-Mäusen signifikant verlängert. Alle anderen Werte unterschieden sich zwischen beiden Genotypen nicht.

3.3.2 Isoflurannarkose bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Tabelle 8: EKG-Werte der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Isoflurannarkose

Isofluran	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR-Intervall (ms)	109 ± 6	104 ± 7	n.s.
HR (bpm)	554 ± 32	579 ± 40	n.s.
P Dauer (ms)	9,2 ± 1,7	9,6 ± 1,5	n.s.
P Amplitude (mV)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,04	n.s.
PR Intervall (ms)	42 ± 5	44 ± 5	n.s.
QRS Intervall (ms)	9,9 ± 1,4	10,5 ± 1,7	n.s.
R Amplitude (mV)	0,72 ± 0,21	0,72 ± 0,16	n.s.
QT-Intervall (ms)	41 ± 8	45 ± 7	n.s.
QTc-Intervall (ms)	39 ± 8	44 ± 6	n.s.
Anzahl (n)	6	6	

Jeweils 6 TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäuse erreichten unter Isoflurannarkose Herzfrequenzen von über 550 Schlägen pro Minute. Bei den gemessenen Zeiten und Intervallen unterschieden sich beide TASK-1-Genotypen nicht voneinander (siehe Tab. 8).

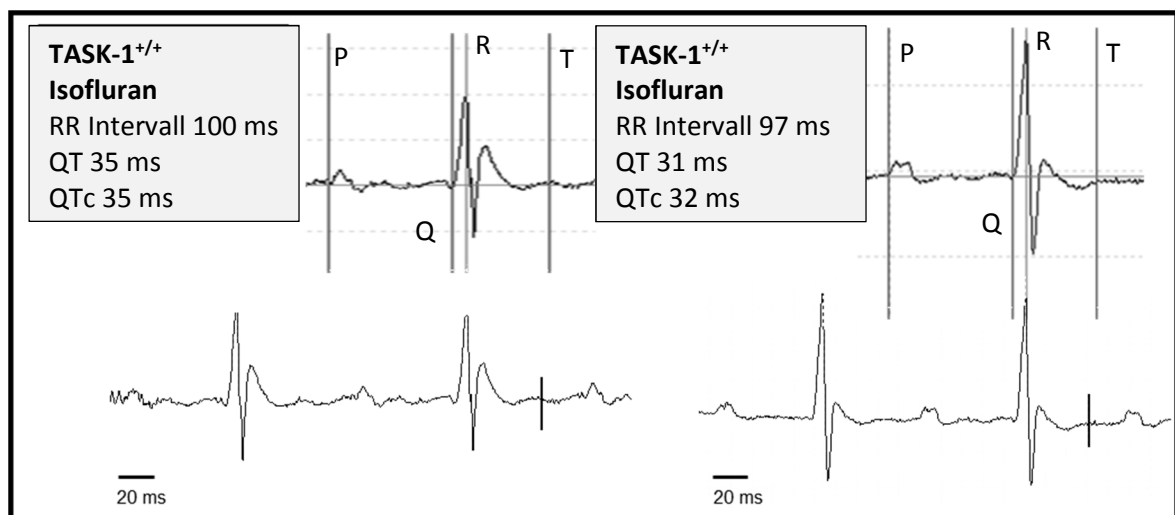


Abbildung 3.1: Beispiele für Isofluran-EKGs bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Modifiziert nach Petric et al., 2012

Oben: Manuelle Festlegung der EKG-Abschnitte einer TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Maus an jeweils einem beispielhaften Einzelschlag. Lediglich die R-Spitze ist vom Computerprogramm (Labchart) vorgegeben.

Unten: Der obere Einzelschlag im EKG-Verlauf.

3.3.3 Avertin®-Narkose bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die Anästhesie mit Avertin® führte bei den 6 Pannexin-1^{+/+} - und 8 Pannexin-1^{-/-} defizienten-Mäusen zu Herzfrequenzen zwischen 430 und 450 Schlägen pro Minute (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®-Narkose

Avertin®	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR-Intervall (ms)	143 ± 18	139 ± 27	n.s.
HR (bpm)	428 ± 53	448 ± 83	n.s.
P Dauer (ms)	10,1 ± 0,9	10,2 ± 1,9	n.s.
P Amplitude (mV)	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,05	n.s.
PR-Intervall (mV)	45 ± 6	45 ± 4	n.s.
QRS-Intervall (ms)	10,1 ± 1,0	10,1 ± 2,7	n.s.
R Amplitude (mV)	0,99 ± 0,2	0,92 ± 0,2	n.s.
QT-Intervall (ms)	45 ± 6	53 ± 5	*p = 0,03
QTc-Intervall (ms)	38 ± 3	45 ± 2	***p = 0,001
Anzahl (n)	6	8	

Die QT-Zeit, sowie das frequenzkorrigierte QTc-Intervall zeigten bei Pannexin-1^{-/-} -Mäusen gegenüber ihren Wildtypwurfgeschwistern eine deutliche Verlängerung. Alle anderen Zeiten und Intervalle waren bei beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich.

3.3.4 Avertin®-Narkose bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Unter Avertin®-Narkose erreichten die 13 TASK-1-defizienten Mäuse und ihre 16 Wildtypwurfgeschwister Herzfrequenzen zwischen 450 und 470 Schlägen pro Minute (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: EKG-Intervalle der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®-Narkose

Avertin®	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR-Intervall(ms)	134 ± 14	131 ± 22	n.s.
HR (bpm)	454 ± 49	468 ± 75	n.s.
P Dauer (ms)	9,3 ± 1,7	9,4 ± 1,7	n.s.
P Amplitude (mV)	0,1 ± 0,03	0,09 ± 0,02	n.s.
PR Intervall (mV)	42 ± 4	45 ± 6	n.s.
QRS Intervall (ms)	9,6 ± 0,9	10,1 ± 1,4	n.s.
R Amplitude (mV)	0,88 ± 0,22	0,58 ± 0,15	***p = 0,0002
QT-Intervall (ms)	42 ± 9	56 ± 8	***p = 0,0002
QTc-Intervall (ms)	37 ± 8	48 ± 4	***p < 0,0002
Anzahl (n)	16	13	

Die R-Amplitude war bei TASK-1^{+/+}-Mäusen signifikant höher, als bei ihren TASK-1-defizienten Wurfgeschwistern, während letztere ein deutlich verlängertes QT- und QTc-Intervall mit einer hohen Signifikanz aufwiesen.

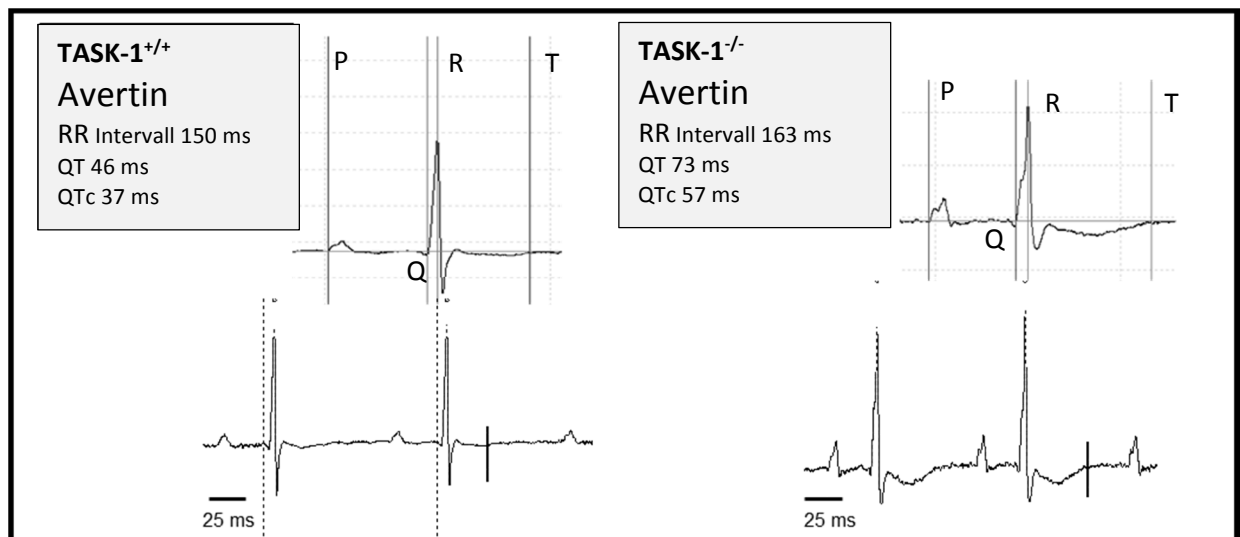


Abbildung 3.2: Beispiele für Avertin®-EKGs bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen
 Modifiziert nach Petric et al., 2012

Oben: Manuelle Festlegung der EKG-Abschnitte einer TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Maus an jeweils einem beispielhaften Einzelschlag. Lediglich die R-Spitze ist vom Computerprogramm (Labchart) vorgegeben.

Unten: Der obere Einzelschlag im EKG-Verlauf.

3.3.5 Pentobarbitalnarkose bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Unter Pentobarbital lagen die Herzfrequenzen der jeweils 7 TASK-1 WT- und KO-Mäuse bei etwa 400 Schlägen pro Minute (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: EKG-Intervalle der TASK-1 WT- und KO-Mäuse unter Pentobarbitalnarkose

Pentobarbital	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR-Intervall (ms)	157 ± 24	148 ± 19	n.s.
HR (bpm)	392 ± 66	413 ± 56	n.s.
P Dauer (ms)	7,1 ± 0,8	8,2 ± 1,7	n.s.
P Amplitude (mV)	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,02	n.s.
PR Intervall (mV)	40 ± 3	41 ± 2	n.s.
QRS Intervall (ms)	9,1 ± 1,8	10,3 ± 1,2	n.s.
R Amplitude (mV)	0,94 ± 0,18	0,58 ± 0,16	**p = 0,002
QT-Intervall (ms)	37 ± 5	58 ± 8	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	29 ± 3	48 ± 5	***p < 0,0001
Anzahl (n)	7	7	

TASK-1^{+/+} -Mäuse wiesen dabei eine signifikant höhere R-Amplitude auf, als ihre TASK-1-defizienten Wurfgeschwister. Bei letzteren waren allerdings sowohl die QT- als auch die QTc-Intervalle bedeutend länger. Alle anderen gemessenen Werte unterschieden sich nicht zwischen beiden Genotypen.

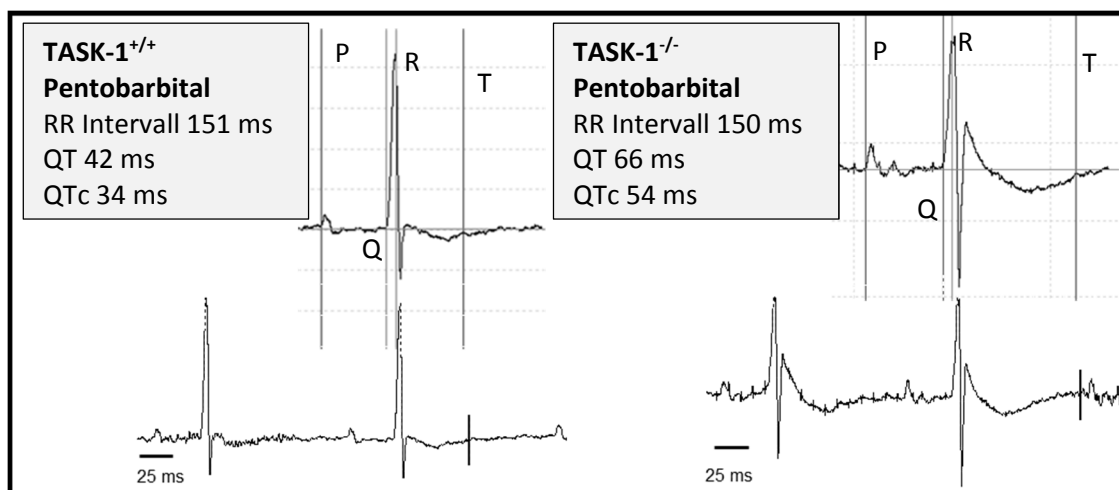


Abbildung 3.3: Beispiele für Pentobarbital-EKGs bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen
Modifiziert nach Petric et al., 2012

Oben: Manuelle Festlegung der EKG-Abschnitte einer TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Maus an jeweils einem beispielhaften Einzelschlag. Lediglich die R-Spitze ist vom Computerprogramm (Labchart) vorgegeben.

Unten: Der obere Einzelschlag im EKG-Verlauf.

3.3.6 Telemetrisch abgeleitete EKGs bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Tabelle 12: Telemetrisch abgeleitete EKG-Werte der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse

Telemetrie	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR (ms)	123 ± 17	116 ± 17	n.s.
HR (bpm)	511 ± 64	544 ± 81	n.s.
P Dauer (ms)	9,3 ± 0,8	9,7 ± 1,2	n.s.
P Amplitude (mV)	0,05 ± 0,02	0,08 ± 0,01	*p = 0,02
PR Intervall (mV)	36 ± 2	37 ± 4	n.s.
QRS Intervall (ms)	10,4 ± 0,6	10,7 ± 0,7	n.s.
R Amplitude (mV)	0,69 ± 0,36	0,81 ± 0,27	n.s.
QT-Intervall (ms)	45 ± 2	50 ± 2	***p = 0,001
QTc-Intervall (ms)	41 ± 4	47 ± 3	**p = 0,007
Anzahl (n)	6	6	

Die telemetrisch abgeleitete Herzfrequenz von je 6 Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen lag bei über 500 Schlägen pro Minute (siehe Tabelle 12). Dabei wiesen die Pannexin-1-defizienten Mäuse bedeutend höhere P-Amplituden auf, als ihre Pannexin-1^{+/+} - Geschwister. Außerdem war neben dem QT-Intervall auch die frequenzkorrigierte QTc-Zeit der Pannexin-1^{-/-} -Mäuse hochsignifikant verlängert.

3.3.7 Telemetrisch abgeleitete EKGs bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Die in der Vergangenheit durchgeführte telemetrische EKG-Ableitung bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen zeigte eine signifikant höhere Herzfrequenz bei TASK-1-defizienten Mäusen, sowie ein verlängertes frequenzkorrigiertes QTc-Intervall (Donner et al., 2010; Petric et al., 2012).

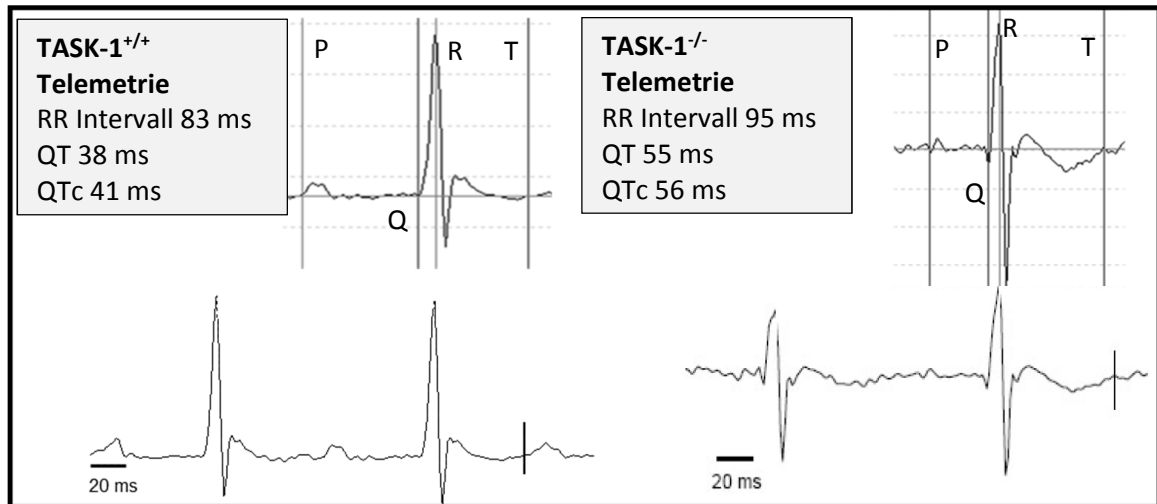


Abbildung 3.4: Beispiele für telemetrisch abgeleitete EKGs bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen
Modifiziert nach Petric et al., 2012

Oben: Manuelle Festlegung der EKG-Abschnitte einer TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Maus an jeweils einem beispielhaften Einzelschlag. Lediglich die R-Spitze ist vom Computerprogramm (Labchart) vorgegeben.

Unten: Der obere Einzelschlag im EKG-Verlauf.

3.3.8 Vergleich der Herzfrequenzen unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier

3.3.8.1 Herzfrequenzen bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die höchsten Herzfrequenzen erreichten wache Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse, deren EKGs telemetrisch abgeleitet wurden. Ähnlich hoch war die Frequenz bei mit Isofluran narkotisierten Mäusen. Die langsamsten Herzfrequenzen wiesen Mäuse unter der Avertin®-Narkose auf. Der Unterschied zwischen diesen und den telemetrisch abgeleiteten Herzfrequenzen führte bei Pannexin-1-defizienten Tieren zu einer statistischen Signifikanz (vergl. Abb. 3.5).

Herzfrequenzen der Pannexin-1-Mäuse

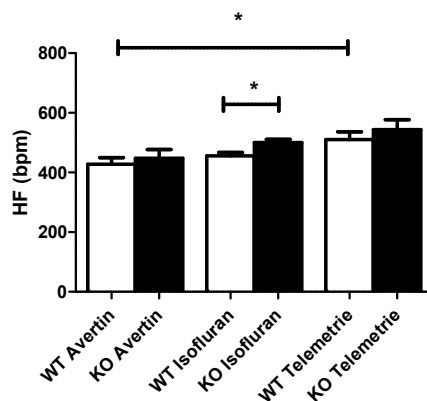


Abbildung 3.5 Herzfrequenzen der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse im Vergleich

Die Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen sind ohne Narkose am höchsten und unter Avertin®-Narkose am langsamsten. Lediglich unter Isofluran unterscheiden sich die Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen.

3.3.8.2 Herzfrequenzen bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Sowohl TASK-1 WT- als auch KO- Mäuse wiesen unter Isoflurannarkose die höchsten Herzfrequenzen auf. Telemetrisch abgeleitete Frequenzen waren ähnlich hoch. Avertin® führte zu geringeren Werten, während die Tiere bei der Pentobarbitalnarkose mit etwa 400 Schlägen pro Minute die niedrigsten Herzfrequenzen erreichten.

Beim Vergleich der schnellsten und langsamsten Herzfrequenzen unter Isofluran und Pentobarbital wurde bei beiden Genotypen eine statistische Signifikanz erreicht. Bei TASK-1-defizienten Mäusen war darüber hinaus auch der Unterschied zwischen unter Isofluran und telemetrisch ermittelten Werten statistisch bedeutsam. Dies wurde auch beim Vergleich von Isofluranfrequenzen mit Avertin®-Werten der TASK-1^{+/+} -Mäuse erreicht (vergl. Abb. 3.6).

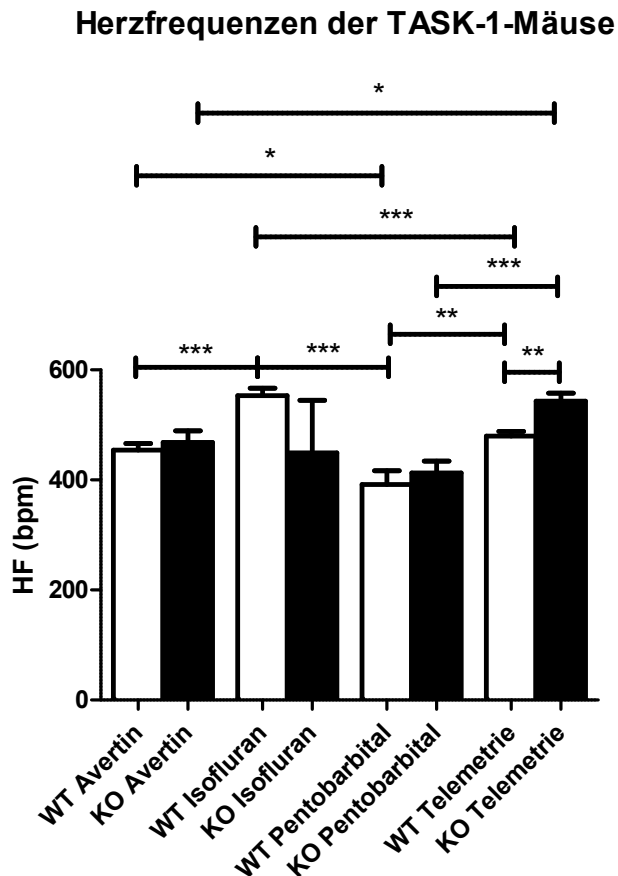


Abbildung 3.6: Herzfrequenzen der TASK-1 WT- und KO-Mäuse im Vergleich

Höchste Herzfrequenzen erreichen beide TASK-1-Genotypen bei der Isoflurannarkose, niedrigste unter Pentobarbital. Ohne Narkose haben TASK-1 KO-Mäuse höhere Herzfrequenzen, als ihre Wildtypwurfgeschwister.

3.3.9 Vergleich des QT-Intervalls unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier

3.3.9.1 QT-Intervalle bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} - Mäusen

Das QT-Intervall war bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen unter der Avertin®-Narkose am längsten. Etwas niedrigere Werte nahm es bei frei beweglichen Mäusen, deren EKGs telemetrisch abgeleitet wurden, an. Kürzeste QT-Zeiten wurden unter Isofluransedation gemessen. Zwischen den QT-Intervallen unter Avertin® und Isofluran bestand bei beiden Genotypen eine statistische Signifikanz (vergl. Abb. 3.7).

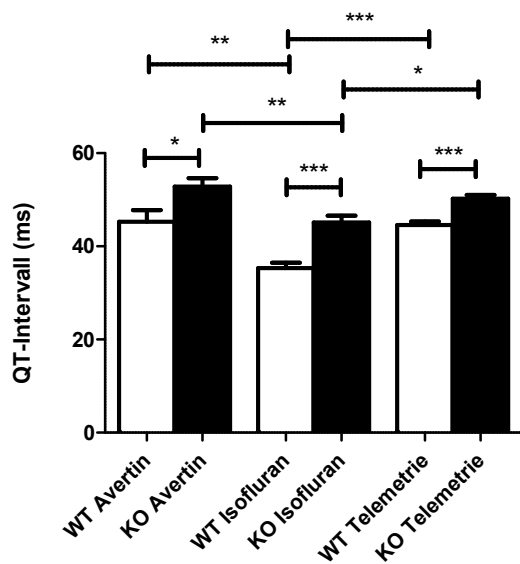


Abbildung 3.7: QT-Intervalle der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse unter Avertin®, Isofluran und ohne Narkose

Die QT-Intervalle der Pannexin-1-Knock-Out-Mäuse sind jeweils signifikant länger, als die der Wildtypen.

Kürzeste QT-Intervalle erreichen beide Genotypen unter Isoflurannarkose.

Betrachtete man die QT-Zeiten der Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäuse in Relation zu ihren RR-Intervallen (siehe Abb. 3.8) wurde deutlich, dass sie sich besonders bei großen RR-Abständen, sprich niedrigen Herzfrequenzen, unterschieden.

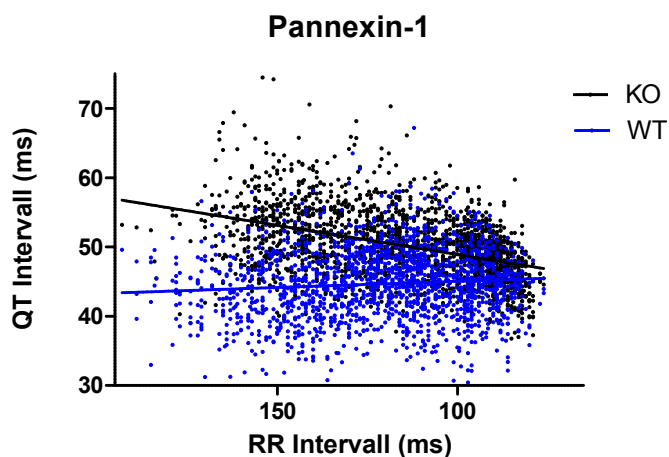


Abbildung 3.8: Vergleich der telemetrisch ermittelten QT-Zeiten von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen

Je größer das RR-Intervall ist, desto stärker unterscheidet sich die Länge des QT-Intervalls beider Pannexin-1-Genotypen.

3.3.9.2 QT-Intervalle bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

TASK-1 WT- und KO-Mäuse zeigten in Bezug auf ihr QT-Intervall kein einheitliches Bild: So wurden bei TASK-1-Wildtypen die längsten durchschnittlichen QT-Zeiten unter Avertin® gemessen, gefolgt von den unter Isoflurannarkose erreichten Werten. Pentobarbital brachte mit Abstand die kürzesten QT-Intervalle.

Im Gegensatz dazu nahm die QT-Zeit von TASK-1^{-/-} -Mäusen unter Pentobarbital die längsten Werte an und lag deutlich über den mit Avertin®- und Isofluran erreichten Werten. Der Unterschied zwischen Pentobarbital und Isofluran war so groß, dass er zu einer statistischen Signifikanz führte (vergl. Abb. 3.9).

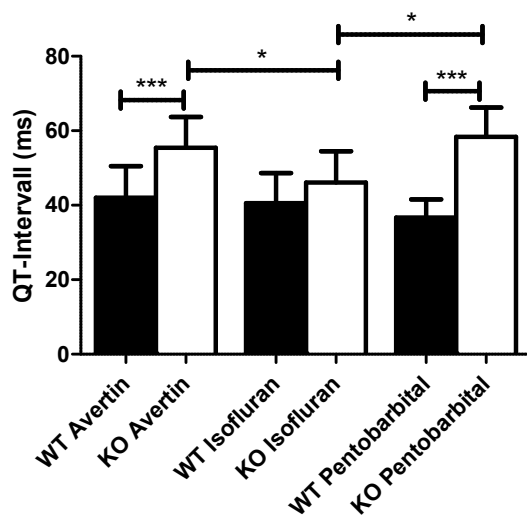


Abbildung 3.9: Vergleich der QT-Intervalle von TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter verschiedenen Narkosen

TASK-1-Knock-Out-Mäuse haben unter Avertin®- und Pentobarbitalnarkose ein signifikant höheres QT-Intervall, als ihre Wildtypwurfgeschwister. Unter Isofluran sind die QT-Intervalle beider Genotypen ähnlich.

Analog zu den Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen wurde hier ebenfalls deutlich, dass sich die QT-Zeiten beider TASK-1-Genotypen besonders unter niedrigen Herzfrequenzen unterschieden (siehe Abb. 3.10).

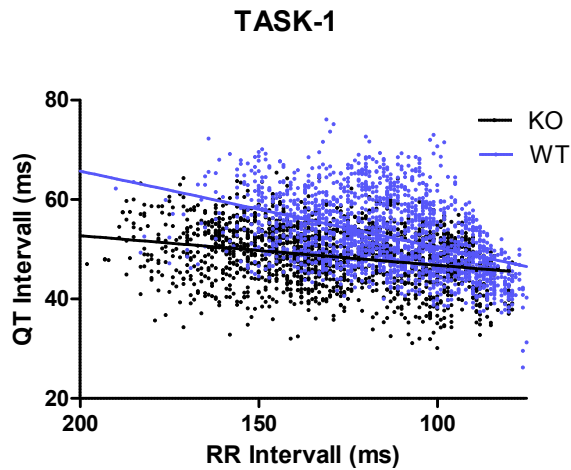


Abbildung 3.10: Vergleich der telemetrisch ermittelten QT-Zeiten von TASK-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen

Je größer das RR-Intervall ist, desto stärker unterscheidet sich die Länge des QT-Intervalls beider TASK-1-Genotypen.

3.3.10 Vergleich des QTc-Intervalls unter verschiedenen Narkosen und am wachen Tier

3.3.10.1 QTc-Intervalle bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Beide Pannexin-1-Genotypen erreichten die längsten frequenzkorrigierten QTc-Zeiten bei telemetrisch abgeleiteten EKGs. Die Avertin®-Narkose führte zu kürzeren QTc-Zeiten. Mit Abstand am kürzesten war das QTc-Intervall bei Mäusen, die mit Isofluran sediert wurden. Seine Werte waren bedeutend kürzer, als bei der Avertin®-Narkose und Telemetrie und erreichten in beiden Fällen und bei beiden Genotypen eine statistische Signifikanz (vergl. Abb. 3.11).

QTc-Intervall unter verschiedenen Narkosen

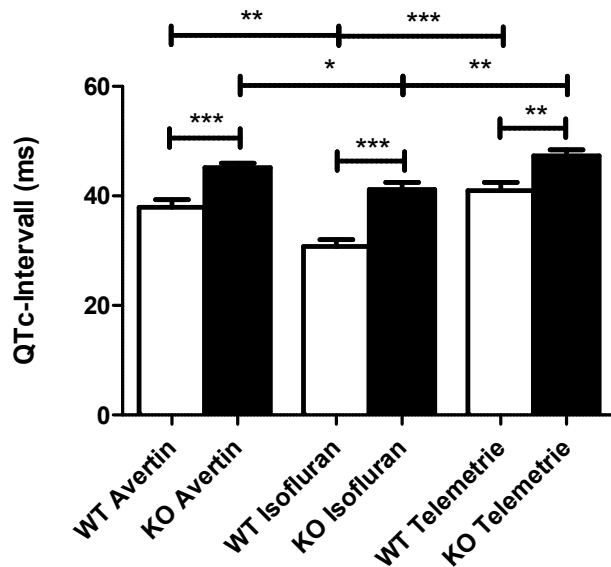
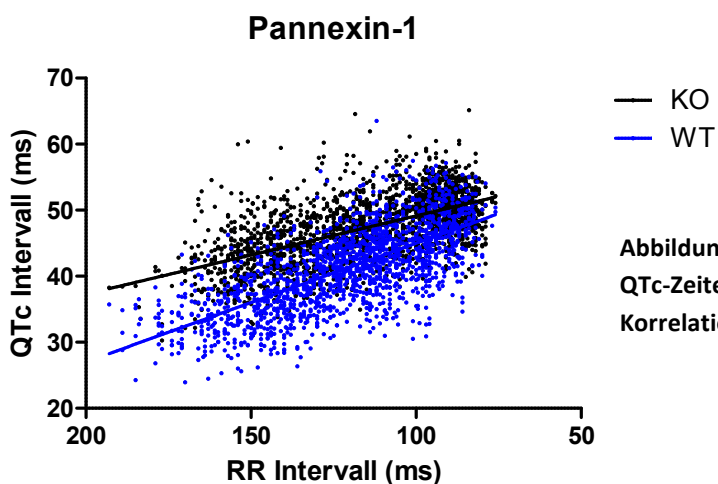


Abbildung 3.11: Vergleich der QTc-Intervalle bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen unter Avertin®, Isofluran und bei wachen Tieren

Das QTc-Intervall ist bei wachen und mit Isofluran bzw. Avertin® narkotisierten Pannexin-1-KO-Mäusen jeweils signifikant länger, als das der Wildtypen.

Trug man die QTc-Intervalle beider Pannexin-1-Genotypen gegen ihre jeweiligen RR-Abstände auf und analysierte sie mittels einer linearen Regression (siehe Abb. 3.12), zeigte sich wie auch schon bei den QT-Zeiten folgendes: Je länger die RR-Intervalle, desto verschiedener waren die QTc-Dauern bei Pannexin-1^{+/+}- und Pannexin-1-defizienten Mäusen.



— KO
— WT

Abbildung 3.12: Vergleich der telemetrisch ermittelten QTc-Zeiten von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen

Je größer das RR-Intervall, desto stärker unterscheidet sich die Länge des QTc-Intervalls zwischen beiden Pannexin-1-Genotypen.

Weil in unserem Fall sowohl die QT- als auch die frequenzkorrigierte QTc-Zeit bei niedrigen Herzfrequenzen am höchsten war, erschien es uns sinnvoll, eine möglicherweise durch die Mitchellformel entstandene Überinterpretation durch den Vergleich mit einer anderen Formel auszuschließen. Dazu berechnen wir die QTc-Zeiten neu nach der beim Menschen häufig genutzten und von Sagie et al. (1992) publizierten Framinghamformel ($QTc = QT + 0,154 \cdot (100 - RR)$) und passten sie auf die hohe Herzfrequenz der Maus an. Das Ergebnis ist aus Abbildung 3.13 ersichtlich:

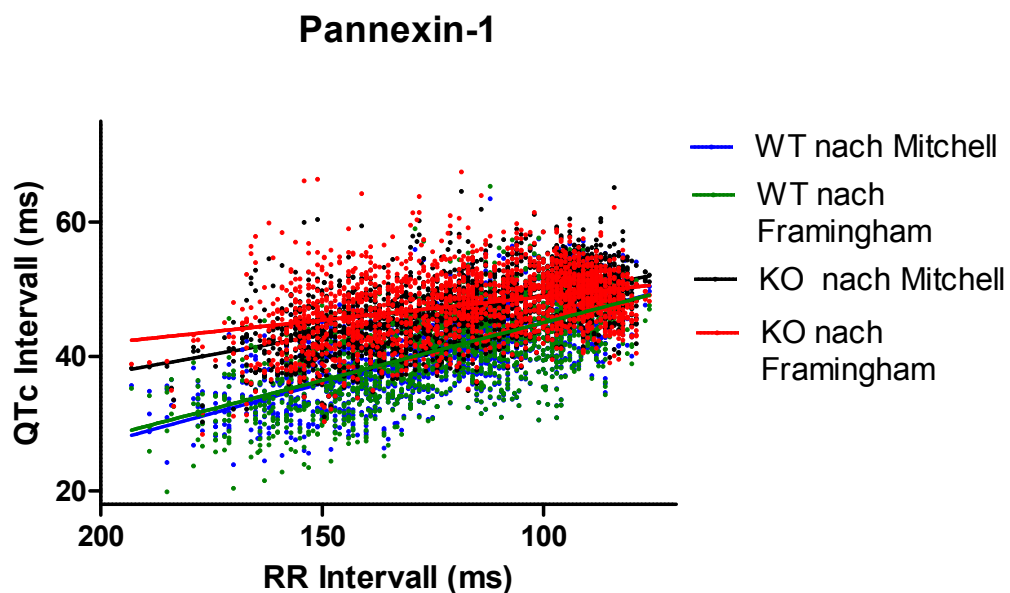


Abbildung 3.13: Vergleich der nach Mitchell und Framingham frequenzkorrigierten QTc-Zeiten beider Pannexin-1-Genotypen

Die nach Mitchell bzw. Framingham berechneten QTc-Intervalle der Pannexin-1-Wildtypen sind nahezu identisch- beide Geraden verlaufen ähnlich.

Die nach Framingham berechneten QTc-Zeiten erreichen bei Pannexin-1-Knock-Out-Mäusen höhere Werte, als die nach Mitchell berechneten. Dies ist besonders bei größeren RR-Intervallen auffällig.

Bei niedrigen Herzfrequenzen von Pannexin-1^{+/+}-Mäusen war die nach beiden Formeln berechnete QTc-Zeit nahezu gleich, dementsprechend ähnlich verlaufen die Regressionsgeraden. Bei Pannexin-1-defizienten Mäusen war das nach Mitchell frequenzkorrigierte QTc-Intervall signifikant kürzer, als nach Framingham ($p < 0,0001$). Bei höheren Herzfrequenzen verhielt es sich umgekehrt.

Trug man die QTc/QT-Relation beider Formeln gegen das jeweilige RR-Intervall auf (siehe Abb. 3.14), war die Relation bei Pannexin-1^{+/+}-Mäusen nach beiden Formeln und die der

Pannexin-1-defizienten Mäuse nach Mitchell beinahe identisch; die jeweiligen Regressionsgeraden verlaufen parallel. Die Berechnung nach Framingham führte bei Pannexin-1^{-/-}-Tieren niedrigerer Herzfrequenzen zu größeren Werten.

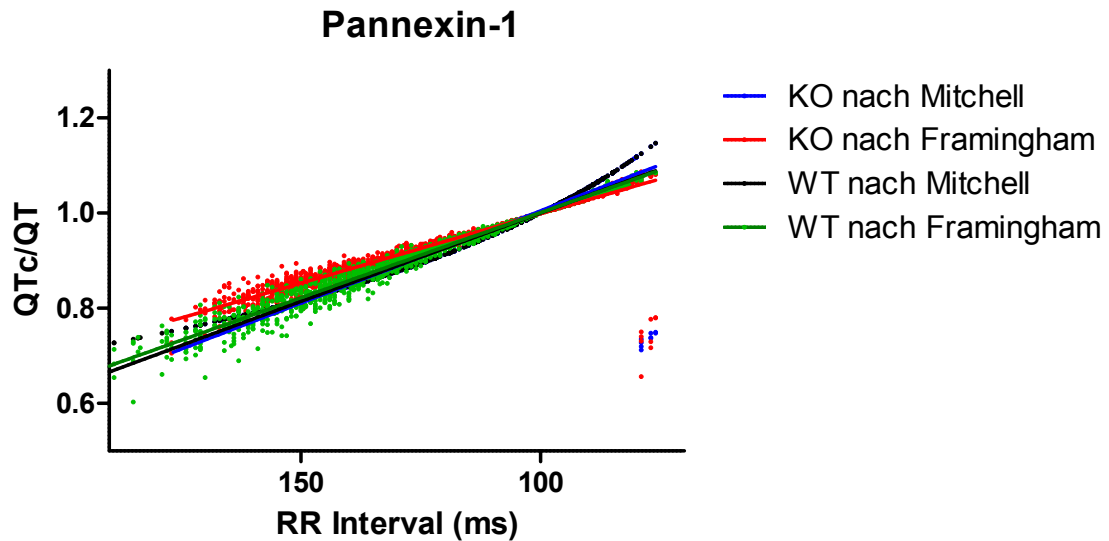


Abbildung 3.14: Verhältnis der QTc/QT-Quotienten beider Pannexin-1-Genotypen zu den jeweiligen RR-Intervallen

Bei einem RR-Intervall von 100ms sind QT- und QTc-Werte identisch. QTc-Berechnungen nach der Mitchellformel führen besonders bei Pannexin-1-defizienten Tieren zu niedrigeren QTc/QT-Werten, (also kürzeren QTc-Intervallen bei niedrigeren Herzfrequenzen).

3.3.10.2 QTc-Intervalle bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

TASK-1-defiziente Mäuse wiesen bei einer Narkose mit Isofluran kürzeste frequenzkorrigierte QTc-Intervalle auf. Die QTc-Zeiten unter Avertin®- und Pentobarbitalnarkose waren hingegen nahezu identisch (vergl. Abb.3.15).

Bei den TASK-1-Wildtypen war das Ergebnis ein anderes: Das im Durchschnitt längste frequenzkorrigierte QTc-Intervall erreichten Mäuse, die mit Isofluran immobilisiert wurden. Darauf folgten die unter Avertin® ermittelten QTc-Zeiten. Deutlich kürzere Intervalle wiesen Mäuse auf, die mit Pentobarbital narkotisiert wurden. Diese Werte waren signifikant kürzer, als die unter Isofluran ermittelten.

QTc-Intervalle unter verschiedenen Narkosen

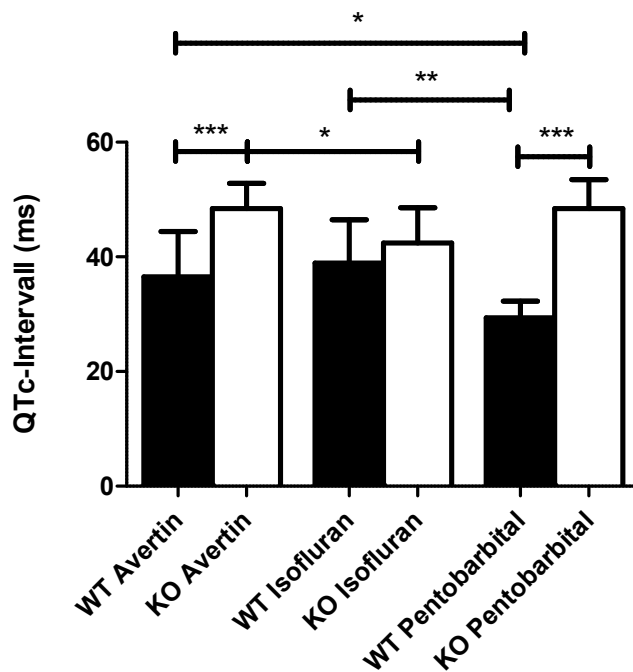


Abbildung 3.15: Vergleich der QTc-Intervalle unter verschiedenen Narkosen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen

Das QTc-Intervall der TASK-1-KO-Mäuse ist unter Avertin®- bzw. Pentobarbitalnarkose signifikant länger, als das der Wildtypen. Unter Isofluran unterscheiden sich die Intervalle beider TASK-1-Genotypen nicht signifikant.

Trug man die QTc-Intervalle beider TASK-1-Genotypen gegen ihre jeweiligen RR-Abstände auf und analysierte sie mittels einer linearen Regression (siehe Abb. 3.16), zeigte sich wie auch schon bei den QT-Zeiten folgendes: Je länger die RR-Intervalle waren, desto stärker unterschieden sich die QTc-Dauern bei TASK-1^{+/+}- und TASK-1-defizienten Mäusen.

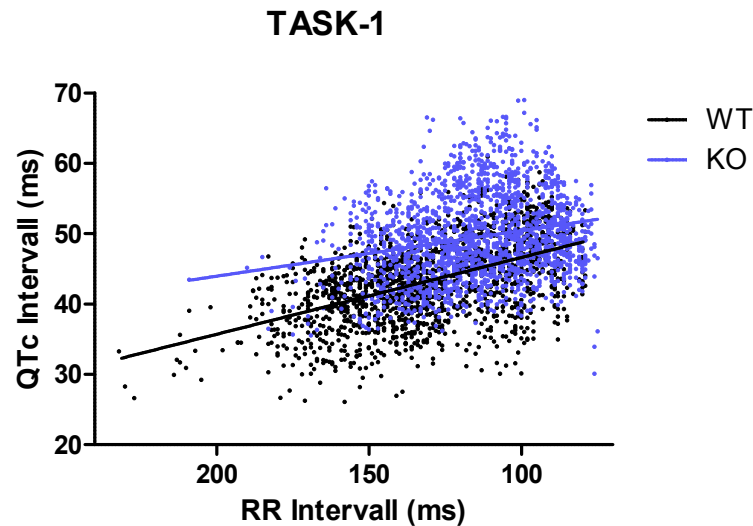


Abbildung 3.16: Vergleich der telemetrisch ermittelten QTc-Zeiten von TASK-1 WT- und KO-Mäusen in Korrelation zu den zugehörigen RR-Intervallen

Mit steigender RR-Intervall-Länge vergrößert sich der Unterschied der QTc-Zeiten zwischen beiden TASK-1-Genotypen.

Weil in unserem Fall, analog zu den Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen, sowohl die QT- als auch die frequenzkorrigierte QTc-Zeit bei niedrigen Herzfrequenzen am höchsten war, erschien es uns sinnvoll, eine durch die Mitchellformel entstandene Überinterpretation durch den Vergleich mit einer anderen Formel auszuschließen. Dazu berechneten wir die QTc-Zeiten neu nach der beim Menschen häufig genutzten, von Sagie et al. (1992) publizierte Framinghamformel. Das Ergebnis ist aus Abbildung 3.17 ersichtlich: Bei niedrigen Herzfrequenzen von TASK-1^{+/+} -Mäusen ist das nach Mitchell frequenzkorrigierte QTc-Intervall kürzer, als nach Framingham ($p < 0,001$). Bei höheren Herzfrequenzen verhält es sich umgekehrt. Beides ist bei TASK-1-defizienten Tieren noch deutlicher; hier findet eine noch stärkere QTc-Verlängerung bei niedrigen Herzfrequenzen statt (Petric et al., 2012).

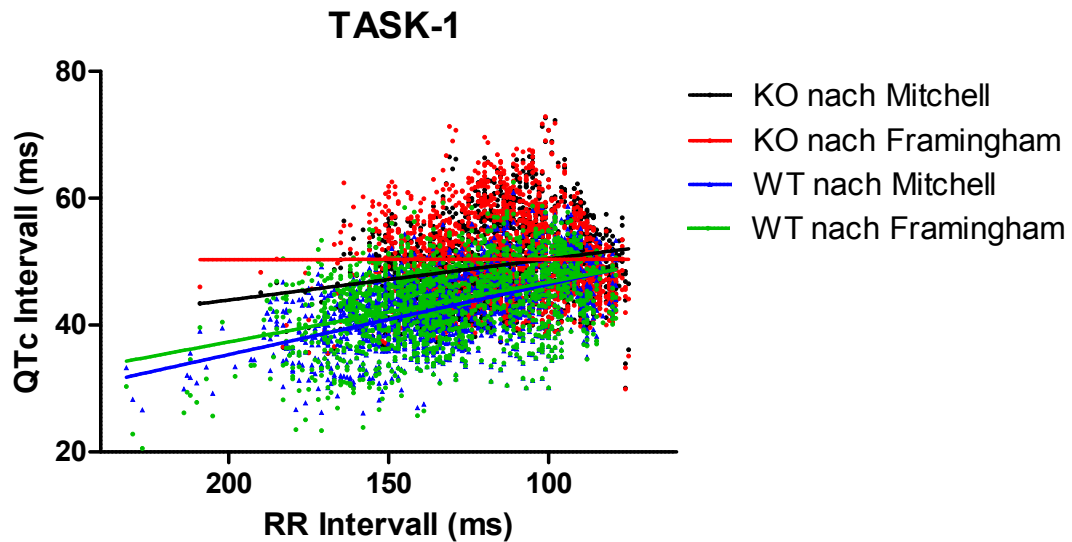


Abbildung 3.17: Vergleich der nach Mitchell und Framingham frequenzkorrigierten QTc-Zeiten der TASK-1 WT- und KO-Mäuse

Bei längeren RR-Intervallen sind die nach Framingham berechneten QTc-Intervalle sowohl bei TASK-1-Wildtypen, als auch bei TASK-1-Knock-Out-Tieren größer, als die nach Mitchell berechneten. Der Unterschied ist bei TASK-1^{-/-}-Mäusen signifikant.

Trug man die QTc/QT-Relation beider Formeln gegen das jeweilige RR-Intervall auf (siehe Abb. 3.18), war die Relation bei TASK-1^{-/-}-Mäusen und niedrigen Herzfrequenzen am kleinsten, wenn die QTc-Zeit nach Mitchell berechnet wurde (siehe Petric et al., 2012).

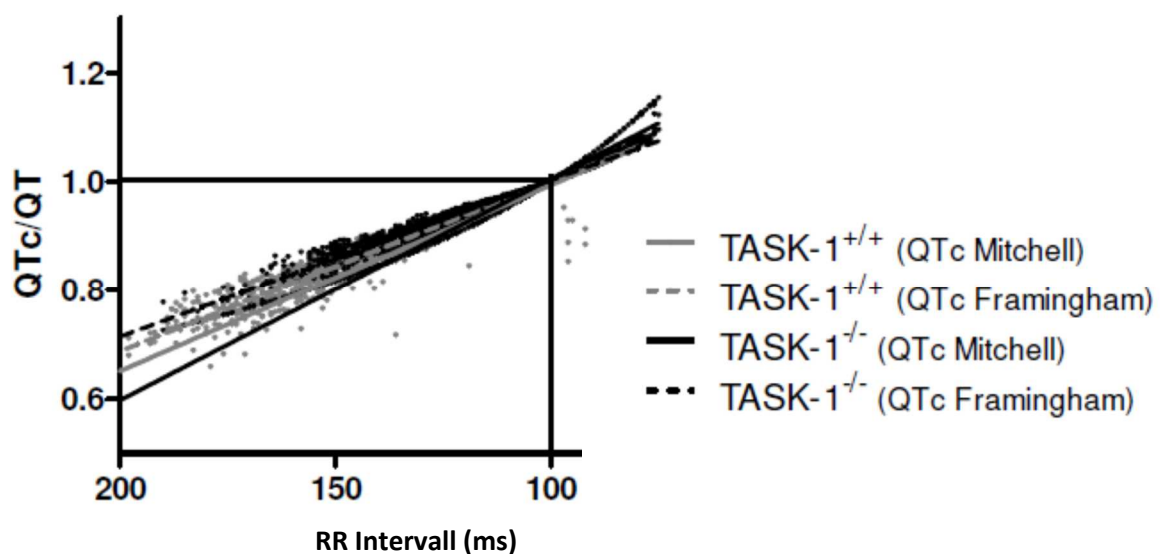


Abbildung 3.18: Verhältnis der QTc/QT-Quotienten beider TASK-1-Genotypen zu den jeweiligen RR-Intervallen

Modifiziert nach Petric et al., 2012

Bei einem RR-Intervall von 100ms sind QT- und QTc-Werte identisch. QTc-Berechnungen nach der Mitchellformel führen bei beiden Genotypen zu niedrigeren QTc/QT-Werten, (also kürzeren QTc-Intervallen bei niedrigeren Herzfrequenzen).

3.3.11 EKG-Veränderungen nach Isoprenalinstimulation unter Avertin®-Narkose

3.3.11.1 Veränderungen bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Erwartungsgemäß stieg die Herzfrequenz der jeweils 6 Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse nach Isoprenalingabe deutlich an. Während sich das QT-Intervall der Pannexin-1^{+/+}-Mäuse unter Isoprenalin nicht veränderte, nahm es bei Pannexin-1-defizienten Mäusen sogar statistisch auffallend kleinere Werte an (siehe Tab. 13 und 14). Im Gegensatz dazu gab es beim frequenzkorrigierten QTc-Intervall bei beiden Genotypen keine Veränderungen nach Alupent® (Wirkstoff: Isoprenalin).

Tabelle 13: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der Pannexin-1^{+/+} -Mäuse vor und nach Isoprenalin

EKG-Werte nach Isoprenalin unter Avertinnarkose	Pannexin-1 ^{+/+} vor Isoprenalin	Pannexin-1 ^{+/+} nach Isoprenalin	Signifikanz
HR (bpm)	457 ± 39	517 ± 19	***p < 0,0001
RR-Intervall (ms)	132 ± 10	116 ± 4	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	42 ± 4	40 ± 7	n.s.
QTc-Intervall (ms)	36 ± 4	37 ± 6	n.s.
Anzahl (n)	6	6	

Tabelle 14: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der Pannexin-1^{-/-} -Mäuse vor und nach Isoprenalin

EKG-Werte nach Isoprenalin unter Avertinnarkose	Pannexin-1 ^{-/-} vor Isoprenalin	Pannexin-1 ^{-/-} nach Isoprenalin	Signifikanz
HR (bpm)	478 ± 54	550 ± 34	***p < 0,0001
RR-Intervall (ms)	127 ± 15	110 ± 7	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	56 ± 5	53 ± 6	*p = 0,01
QTc-Intervall (ms)	50 ± 4	51 ± 5	n.s.
Anzahl (n)	6	6	

Verglich man beide Pannexin-1-Genotypen miteinander, zeigten sie vor Isoprenalin ähnliche Herzfrequenzen. Allerdings unterschieden sie sich bedeutend in der Länge ihrer

QT- und QTc-Intervalle: Beide sind bei Pannexin-1^{-/-}-Tieren hochsignifikant länger (siehe Tab. 15).

Tabelle 15: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider Pannexin-1-Genotypen vor Isoprenalin

EKG-Werte vor Isoprenalin unter Avertinnarkose	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR (ms)	132 ± 10	127 ± 15	n.s.
HR (bpm)	457 ± 39	478 ± 54	n.s.
QT-Intervall (ms)	42 ± 4	56 ± 5	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	36 ± 4	50 ± 4	***p < 0,0001
Anzahl (n)	6	6	

Nach der Injektion des Alupents® stiegen die Herzfrequenzen der Pannexin-1-defizienten Mäuse deutlich höher an, als die ihrer Wildtypwurfgeschwister (siehe Tab. 16). Der Unterschied ihrer durchschnittlichen RR-Abstände und Herzfrequenzen ist statistisch hochsignifikant. Bezüglich der QT- und QTc-Zeiten bringt das Isoprenalin keine Veränderung: Beide Intervalle bleiben bei Pannexin-1^{-/-}-Mäusen deutlich verlängert. Allerdings werden die QT-Zeiten unter Isoprenalin bei beiden Genotypen tendenziell eher etwas kürzer, während die frequenzkorrigierten QTc-Werte beinahe identisch bleiben (siehe Tab. 15 und 16).

Tabelle 16: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider Pannexin-1-Genotypen nach Isoprenalin

EKG-Werte nach Isoprenalin unter Avertinnarkose	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR (ms)	116 ± 4	110 ± 7	***p < 0,0001
HR (bpm)	517 ± 19	550 ± 34	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	40 ± 7	53 ± 6	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	37 ± 6	51 ± 5	***p < 0,0001
Anzahl (n)	6	6	

3.3.11.2 Veränderungen bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Auch bei den TASK-1 WT- und KO-Mäusen stieg die Herzfrequenz nach Injektion des Isoprenalin signifikant an (siehe Tabellen 17 und 18). Die QT- und QTc-Intervalle nahmen bei TASK-1^{+/+} -Mäusen vor und nach Isoprenalin in etwa gleiche Werte an (siehe Tab. 17), während beide sich bei TASK-1-defizienten Tieren unter Alupent® deutlich und statistisch auffällig verkürzten (siehe Tab. 18).

Tabelle 17: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der TASK-1^{+/+} -Mäuse vor und nach Isoprenalin

EKG-Werte unter Avertinnarkose	TASK-1 ^{+/+} vor Isoprenalin	TASK-1 ^{+/+} nach Isoprenalin	Signifikanz
HR (bpm)	465 ± 39	528 ± 20	***p < 0,0001
RR-Intervall (ms)	130 ± 11	114 ± 4	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	44 ± 5	42 ± 6	n.s.
QTc-Intervall (ms)	38 ± 6	39 ± 6	n.s.
Anzahl (n)	72	79	

Tabelle 18: Herzfrequenzen und QT-Intervalle der TASK-1^{-/-} -Mäuse vor und nach Isoprenalin

EKG-Werte unter Avertinnarkose	TASK-1 ^{-/-} vor Isoprenalin	TASK-1 ^{-/-} nach Isoprenalin	Signifikanz
HR (bpm)	444 ± 41	504 ± 37	***p < 0,0001
RR-Intervall (ms)	137 ± 14	120 ± 9	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	61 ± 8	54 ± 5	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	52 ± 5	49 ± 4	**p = 0,002
Anzahl (n)	40	43	

Beim Vergleich der Genotypen untereinander fiel auf, dass TASK-1-defiziente Mäuse vor Isoprenalin bereits eine bedeutend höhere Herzfrequenz besaßen, als ihre TASK-1^{+/+} - Geschwister (siehe Tab. 19). Unter Alupent® wurde der Unterschied noch deutlicher (siehe Tab. 20). QT- und frequenzkorrigierte QTc-Intervalle nahmen bei TASK-1^{-/-} -Mäusen vor und nach Isoprenalin signifikant höhere Werte ein (siehe Tabellen 19 und 20).

Tabelle 19: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider TASK-1-Genotypen vor Isoprenalin

EKG-Werte vor Isoprenalin unter Avertinnarkose	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR (ms)	130 ± 11	137 ± 14	**p = 0,006
HR (bpm)	465 ± 39	444 ± 41	**p = 0,009
QT-Intervall (ms)	44 ± 5	61 ± 8	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	38 ± 6	52 ± 5	***p < 0,0001
Anzahl (n)	72	40	

Tabelle 20: Herzfrequenzen und QT-Intervalle beider TASK-1-Genotypen nach Isoprenalin

EKG-Werte nach Isoprenalin unter Avertinnarkose	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR (ms)	114 ± 4	120 ± 9	***p < 0,0001
HR (bpm)	528 ± 20	504 ± 37	***p < 0,0001
QT-Intervall (ms)	42 ± 6	54 ± 5	***p < 0,0001
QTc-Intervall (ms)	39 ± 6	49 ± 4	***p < 0,0001
Anzahl (n)	79	43	

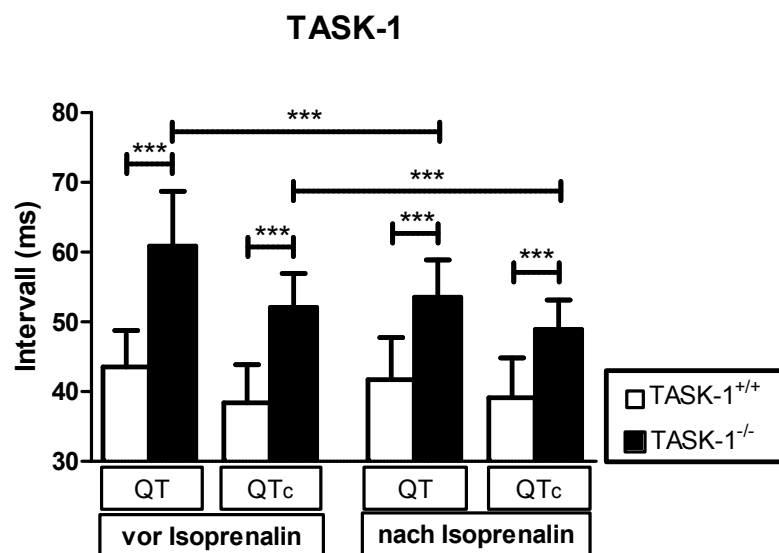


Abbildung 3.19: Vergleich der QT- und QTc-Intervalle von TASK-1 WT- und KO-Mäusen vor und nach Isoprenalin

Modifiziert nach Petric et al., 2012

3.4 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) am Mäuseherzen

3.4.1 AV-Messung bei Pannexin-1- und TASK-1- WT- und KO-Mäusen

Die Messung der AH-, HV- und AV- Intervalle ergab weder bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen, noch bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Petric et al., 2012; Petric et al., 2016).

3.4.2 Ermittlung der Reizschwelle

Bis auf wenige Ausnahmen fand sowohl bei TASK-1 WT- und KO- Mäusen, als auch bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen die Stimulation mit der doppelten Reizschwelle statt. In den seltenen Fällen, in denen diese erfolglos überschritten wurden, war es sinnvoll, als erstes die Katheterposition mittels verschiedener intrakardialer Signale zu überprüfen- und nicht sofort den elektrischen Impuls weiter zu erhöhen.

3.4.3 Stimulation nach Protokoll (siehe Anhang)

Obgleich alle elektrophysiologischen Untersuchungen nach dem gleichen Protokoll abliefen, war es nicht möglich, jeden einzelne Punkt pro Maus zu analysieren. Dies lag daran, dass die spontane Herzfrequenz mancher Tiere höher war, als die stimulierte Frequenz und somit kein Capture, also keine Übernahme der stimulierten Frequenz, ermöglichte. So erklärt sich die unterschiedliche n-Zahl der einzelnen Untersuchungsunterpunkte bei Pannexin-1- und TASK-1-Mäusen beider Genotypen.

3.4.4 Ergebnisse der EPU bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die bei der EPU ermittelten Werte unterschieden sich zwischen beiden Pannexin-1-Genotypen nicht (siehe Tab. 21).

Tabelle 21: Bei der EPU ermittelte Werte von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

EPU	Pannexin-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
WBP (ms)	78 ± 6	7	80 ± 7	6	n.s.
SNRT 100 (ms)	148 ± 24	4	164 ± 17	6	n.s.
AVNRP 120 (ms)	52 ± 9	3	54 ± 6	4	n.s.
AVNRP 110 (ms)	52 ± 9	6	48 ± 10	4	n.s.
AVNRP 100 (ms)	59 ± 8	7	55 ± 10	5	n.s.
ARP 120 (ms)	47 ± 3	3	52 ± 7	3	n.s.
ARP 110 (ms)	48 ± 7	5	47 ± 11	4	n.s.
ARP 100 (ms)	52 ± 8	5	49 ± 12	5	n.s.
VRP 120 (ms)	56 ± 12	4	50 ± 11	4	n.s.
VRP 110 (ms)	51 ± 10	4	50 ± 12	4	n.s.
VRP 100 (ms)	53 ± 9	4	47 ± 9	6	n.s.
SNRTc 100 (ms)	44 ± 28	7	61 ± 50	6	n.s.
SNRT (%)	130 ± 33	7	153 ± 39	6	n.s.

3.4.5 Ergebnisse der EPU bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen waren die gemessenen Zeiten ebenfalls sehr ähnlich; lediglich die SNRT unterschied sich signifikant zwischen beiden Genotypen (siehe Tabelle 22). Sie war bei den TASK-1-Wildtypen deutlich länger.

Tabelle 22: Bei der EPU ermittelte Werte von TASK-1 WT- und KO-Mäusen

EPU	TASK-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	TASK-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
WBP (ms)	81 ± 7	13	81 ± 6	12	n.s.
SNRT 100 (ms)	179 ± 33	15	156 ± 23	12	*p = 0,04
AVNRP 120 (ms)	57 ± 11	9	55 ± 7	7	n.s.
AVNRP 110 (ms)	56 ± 10	14	55 ± 8	11	n.s.
AVNRP 100 (ms)	62 ± 9	14	57 ± 10	11	n.s.
ARP 120 (ms)	50 ± 12	10	54 ± 6	5	n.s.
ARP 110 (ms)	50 ± 10	14	51 ± 9	10	n.s.
ARP 100 (ms)	54 ± 10	14	51 ± 9	10	n.s.
VRP 120 (ms)	62 ± 17	9	55 ± 7	5	n.s.
VRP 110 (ms)	57 ± 15	12	59 ± 7	6	n.s.
VRP 100 (ms)	58 ± 16	12	58 ± 7	8	n.s.
SNRTc 100 (ms)	44 ± 22	15	40 ± 14	10	n.s.
SNRT (%)	133 ± 14	15	122 ± 17	12	n.s.

3.4.6 Atriale und ventrikuläre Burststimulation

Während der hochfrequenten Burststimulationen, bei denen der Ventrikel oder Vorhof 5s lang mit jeweils 50 bis 10ms Abstand erregt wurde, traten Rhythmusstörungen wie Tachykardien auf. Aufgrund der hohen Frequenz führte nicht jeder Stimulationsimpuls zu einer Myokardantwort, sondern fiel in die relative Refraktärperiode und hatte so eine potentiell arrhythmieauslösende Wirkung.

3.4.7 Ergebnisse der Burststimulation bei Pannexin-1^{+/+}- und Pannexin-1^{-/-}-Mäusen

Bei 7 von 8 untersuchten Pannexin-1-defizienten Tieren konnte unter unseren experimentellen Bedingungen nach atrialer Burststimulation mehrfach ein selbst limitierendes Vorhofflimmern ausgelöst werden. Es war in allen Fällen reproduzierbar.

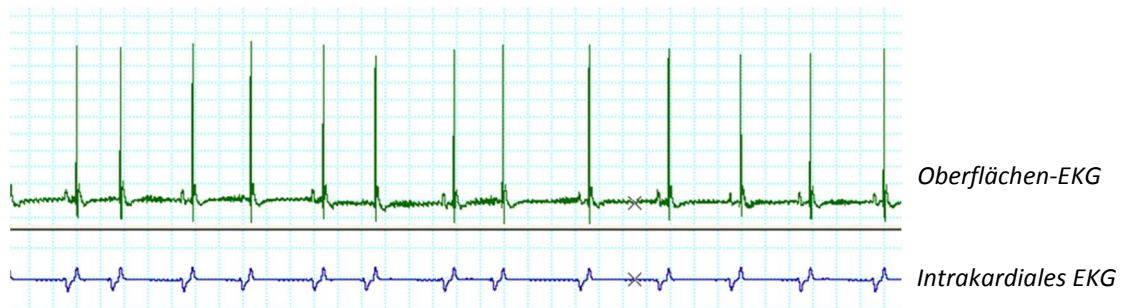


Abbildung 3.20: Beispiel für eine AV-Dissoziation bei einer Pannexin-1-defizienten Maus

Im Gegensatz dazu konnte bei keiner einzigen der 7 untersuchten Pannexin-1^{+/+}-Mäuse ein Vorhofflimmern induziert werden. In der Regel war das Flimmern oder Flattern klar vom Übergang in einen Sinusrhythmus abzugrenzen (vgl. Abbildung 3.21).

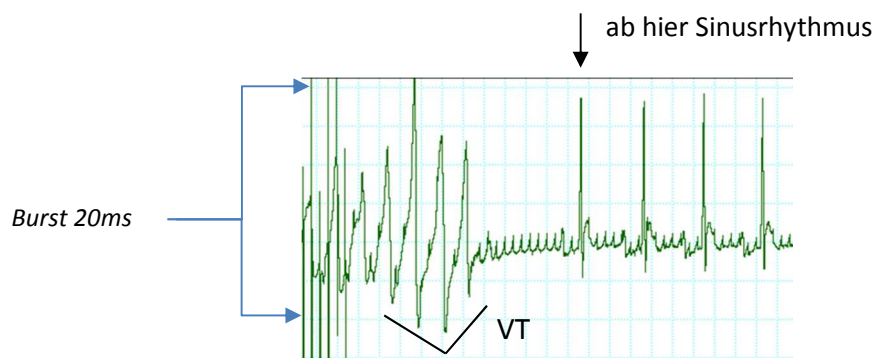


Abbildung 3.21: Beispiel für eine ventrikuläre Tachykardie einer Pannexin-1-defizienten Maus nach einem ventrikulären Burst bei 20ms

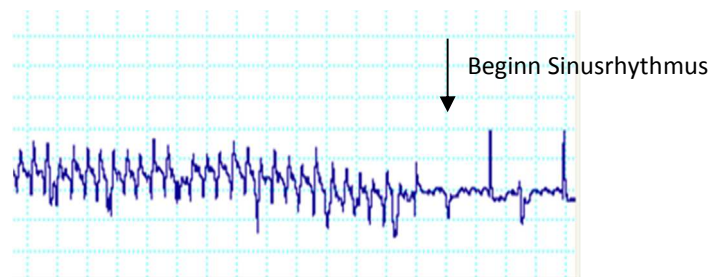


Abbildung 3.22: Beispiel für eine atriale Tachykardie bei einer Pannexin-1-defizienten Maus nach einem atrialen Burst bei 10ms

Im Durchschnitt trat die Vorhofftachykardie bei jeder der 7 Arrhythmien zeigenden Pannexin-1^{-/-}-Mäuse 6 Mal auf, wobei jeder der 5 Bursts 2 Mal vor und 2 Mal nach der Isoprenalininjektion durchgeführt wurde.

Alle Mäuse kehrten spontan wieder zu ihrem eigenen Rhythmus zurück.

Tabelle 23: Vorkommen von AV-Dissoziationen und atrialen Tachyarrhythmien bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

AV-Dissoziation*	AV-Dissoziation*	Atriale Tachyarrhythmie	Atriale Tachyarrhythmie
Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}
0	1	0	9
0	1	0	7
0	1	0	9
1	1	0	0
0	1	0	4
0	1	0	8
0	1	0	3
	1		8

*= qualitativer Wert

Das Vorhofflattern oder -Flimmern umfasste jeweils unterschiedliche Zeitdauern und maß im kürzesten Fall 0,15s, im längsten dagegen ganze 12,4s. Die durchschnittliche Dauer betrug 2,7s.

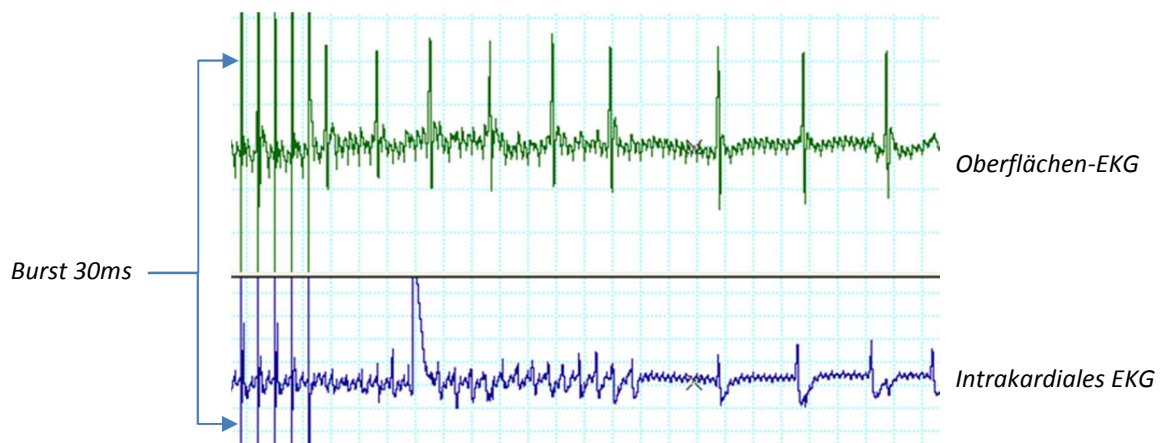


Abbildung 3.23: Atriale Tachyarrhythmie nach einem atrialen Burst mit 30ms bei einer Pannexin-1-defizienten Maus

Zwei Drittel aller Tachyarrhythmien traten dabei direkt im Anschluss an einen atrialen Burst auf, nur eine einzige nach atrialem Burst unter Isoprenalin (siehe Abb. 3.24).

Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien in Abhängigkeit von der Art der Stimulation

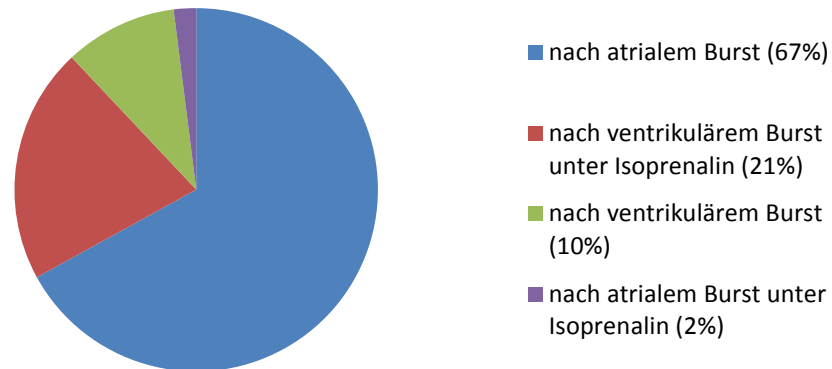


Abbildung 3.24: Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien nach verschiedenen Bursts bei Pannexin-1^{-/-} - Mäusen

Was die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Tachykardien betraf, so zeigte sich ein klares Bild: Je kürzer die stimulierten Zykluslängen, desto häufiger traten Tachyarrhythmien auf. So zeigten sich über die Hälfte aller atrialen Tachyarrhythmien bei der hochfrequentesten Burststimulation mit 10ms, halb so viele nur noch bei 20ms (siehe Abb. 3.25).

Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz des Bursts

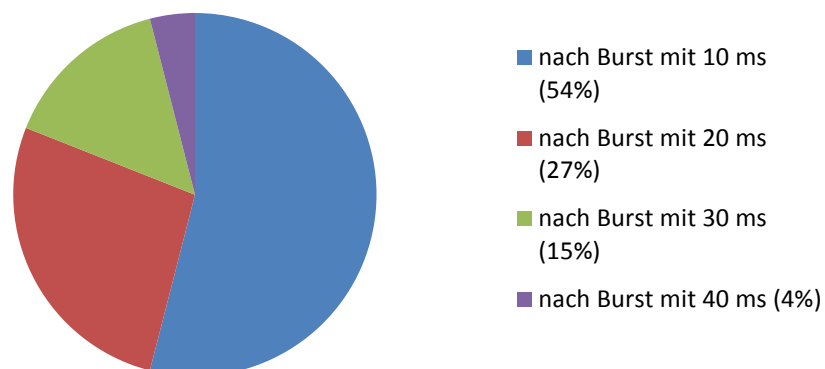


Abbildung 3.25: Auftreten von atrialen Tachyarrhythmien bei Pannexin-1^{-/-} -Mäusen nach Bursts verschiedener Stimulationsfrequenzen

Am häufigsten trat ein Vorhofflimmern bei Pannexin-1-defizienten Mäusen nach atrialem Burst von 10ms ohne Isoprenalingabe auf.

Zu ventrikulären Extrasystolen und höhergradigen ventrikulären Herzrhythmusstörungen nach Burststimulationen kam es bei beiden Genotypen selten (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Rhythmusstörungen nach Burststimulationen bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Rhythmusstörungen nach Bursts	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
VES	1/1*	1/1*	n.s.
Couplet und Triplet	1/1*	3/3*	n.s.
VT	0/0*	6/3*	n.s.
AT	0/0*	48/7*	
Anzahl (n)	7	8	

**absolute Anzahl Events/Anzahl der Tiere mit Events*

3.4.8 Ergebnisse der Burststimulation bei TASK-1^{+/+}-und TASK-1^{-/-}-Mäusen

Bei Burststimulationen der TASK-1 WT- und KO-Mäuse zeigten sich entgegen unserer Erwartungen keine statistischen Unterschiede zwischen beiden Genotypen. So traten bei TASK-1^{+/+}-Mäusen und ihren TASK-1-defizienten Wurfgeschwistern etwa gleich häufig ventrikuläre Extrasystolen, Couplets und Triplets, sowie ventrikuläre Tachykardien auf (siehe Tabelle 25). Keine einzige TASK-1^{-/-}-Maus zeigte hingegen eine atriale Tachykardie.

Tabelle 25: Rhythmusstörungen nach Burststimulationen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen

Rhythmusstörungen nach Bursts	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
VES	10/4*	11/4*	n.s.
Couplet und Triplet	6/3*	7/3*	n.s.
VT	3/2*	4/3*	n.s.
AT	3/3*	0/0*	n.s.
Anzahl (n)	16	12	

** absolute Anzahl der Ereignisse/Anzahl der Tiere mit Ereignissen*

Tabelle modifiziert nach Petric et al., 2012

Bei beiden TASK-1-Genotypen waren AV-Dissoziationen zu finden. Zwar kamen sie bei TASK-1-defizienten Mäusen etwas häufiger vor (im Schnitt 4,2 pro Maus; bei TASK-1^{+/+} - Mäusen hingegen nur 2,3 pro Tier), laut Statistik lag aber kein signifikanter Unterschied vor (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Auftreten von AV-Dissoziationen bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen

AV-Dissoziationen	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
	0,9 ± 1	2,1 ± 3	n.s.
Anzahl (n)	16	12	

3.5 Telemetrische EKG-Ableitungen bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} - Mäusen

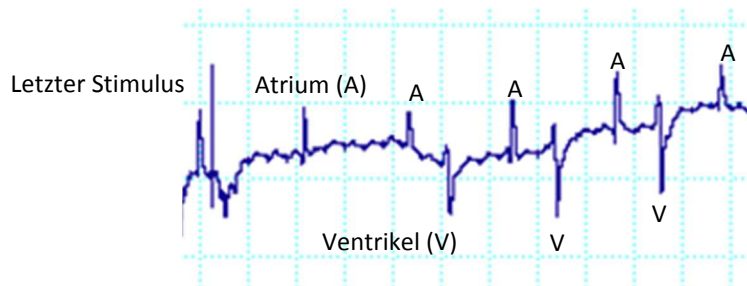
3.5.1 Auffälligkeiten im 24-Stunden-EKG

Wie bereits unter 3.5.4 erwähnt, zeigten die 10 Pannexin-1-defizienten Mäuse im telemetrisch abgeleiteten EKG signifikant längere QT- und frequenzkorrigierte QTc-Intervalle, als ihre 12 Wildtypwurfgeschwister. Diesem Ergebnis lagen EKG-Abschnitte aus der Tagphase des Langzeit-EKGs, der Ruhephase der Tiere, zugrunde. Neben unserer manuellen Auswertung einzelner Herzschläge berechnete das Computerprogramm die durchschnittliche Herzfrequenz der Mäuse über die gesamten 24h. Diese lag während des gesamten Langzeit-EKGs zwischen 510 und 560 Schlägen pro Minute. Dabei erreichten die Tiere tagsüber erwartungsgemäß niedrigere Frequenzen, als in ihrer aktiven Nachtphase.

Tabelle 27: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Langzeit-EKG					
HF (bpm)	Pannexin-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
Tag Ø	492 ± 67	12	530 ± 84	10	n.s.
Nacht Ø	535 ± 60	12	585 ± 78	10	n.s.
24h Ø	514 ± 66	24	558 ± 84	20	n.s.

Weiterhin waren das Auftreten der bereits erwähnten AV-Dissoziationen und der AV-Blöcke von Bedeutung: Letztere traten im Langzeit-EKG zwar bei beiden Genotypen auf, häuften sich aber bei Pannexin-1-defizienten Mäusen und führten zu einer statistischen Signifikanz (siehe Tabelle 28).

**Abbildung 3.26: Beispiel für einen AV-Block II direkt im Anschluss an eine Burststimulation**

Auf den ersten spontanen Vorhofimpuls nach der Stimulation folgt kein Kammerimpuls. Stattdessen kommt es zu einer erneuten Vorhofaktion, auf die eine Kammerkontraktion folgt- und damit beginnt wieder ein Sinusrhythmus.

Tabelle 28: AV-Blöcke bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen im 24-Stunden-EKG

AV-Blöcke im 24-Stunden-EKG	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
Tag	2,3 ± 0,6	10 ± 4,4	n.s.
Nacht	1,1 ± 0,3	8,9 ± 3,5	*p = 0,02
24 h	3,4 ± 0,8	18,9 ± 7,8	*p = 0,05
Anzahl (n)	11	10	

Im gesamten Langzeit-EKG zählten wir bei Pannexin-1^{+/+}-Mäusen 37 AV-Blöcke, während in der gleichen Zeit bei den Pannexin-1^{-/-}-Tieren 189 auftraten.

Beide Pannexin-1-Genotypen zeigten im Langzeit-EKG gleich viele ventrikuläre Extrasystolen (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Durchschnittliches Auftreten von VES bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen im Langzeit-EKG

VES	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
Tag	0,5 ± 0,2	1,2 ± 0,7	n.s.
Nacht	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,7	n.s.
24 h	1,2 ± 0,4	2,7 ± 1,3	n.s.
Anzahl (n)	11	9	

3.5.2 Schwimmversuche

3.5.2.1 Herzfrequenzen vor, während und nach dem Schwimmen

Erwartungsgemäß kam es bei beiden Pannexin-1-Genotypen während der aktiven Schwimmbewegungen zu einem signifikanten Herzfrequenzanstieg im Vergleich zur Ruhefrequenz (siehe Tab. 30). Die mittlere Herzfrequenz der Pannexin-1-defizienten-Mäuse unterschied sich weder vor, noch während des Schwimmens, oder in der Erholungsphase von Pannexin-1^{+/+}-Tieren (siehe Tab. 36).

Tabelle 30: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Schwimmens

SV	HF vor SV	Max HF SV	Anzahl	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	623 ± 114	778 ± 38	n=13	*p = 0,013
Pannexin-1 ^{-/-}	694 ± 87	792 ± 15	n=7	***p < 0,0001

3.5.2.2 Rhythmusstörungen während des Schwimmens

Während der körperlichen Belastung beim Schwimmen traten bei beiden Pannexin-1-Genotypen gleichermaßen vereinzelt AV-Blöcke auf. Extrasystolen waren bei beiden Genotypen kaum zu finden. In beiden Fällen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.5.3 Laufbandversuch I ohne Steigung

Statistisch gesehen ergaben sich zwischen Mäusegewichten, gelaufener Distanz und erreichter Endgeschwindigkeit keine Differenzen zwischen Pannexin-1-Wildtypen und - Knock-Out-Mäusen (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Ergebnisse des Laufbandversuches I bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Laufbandversuch 1	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
Mausgewicht inkl Transmitter (g)	26 ± 1	32 ± 8	n.s.
Transmittergewicht in % des Mausgewichts	7,2 ± 0,3	6,2 ± 1,5	n.s.
gelaufene Distanz (m)	360 ± 37	377 ± 38	n.s.
Endgeschwindigkeit (m/min)	18 ± 3	18 ± 2	n.s.
Anzahl (n)	7	7	

3.5.3.1 Herzfrequenzen vor, während und nach dem Laufen

In der Eingewöhnungsphase auf dem Laufband erreichten Pannexin-1-defiziente Mäuse signifikant höhere mittlere Herzfrequenzen, als ihre Wildtypwurfgeschwister. Während der körperlichen Betätigung stieg die mittlere Herzfrequenz beider Pannexin-1-Genotypen wie erwartet deutlich an (siehe Tab. 32) und unterschied sich, wie auch in der Erholungsphase, bei beiden Genotypen nicht (siehe Tab. 36).

Tabelle 32: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Laufbandversuches ohne Steigung

LB ohne Steigung	HF vor LB I	Max HF LB I	Anzahl	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	669 ± 90	809 ± 12	n=7	**p = 0,004
Pannexin-1 ^{-/-}	753 ± 39	790 ± 15	n=7	**p = 0,003

3.5.3.2 Rhythmusstörungen während des Laufens auf dem Laufband ohne Steigung

Während des Laufens auf dem geraden Laufband traten bei Pannexin-1-Wildtypen und ihren Pannexin-1^{-/-}-Geschwistern weder AV-Blöcke, noch Extrasystolen auf.

3.5.4 Laufbandergometrie II mit Steigung

Auch das zweite Laufbandprotokoll, welches durch den Einbau von Steigungen eine Erweiterung des ersten Protokolles darstellt, wurde von beiden Mausgruppen gleich gut gemeistert: So unterschieden sich weder die gelaufene Distanz, noch die Endgeschwindigkeit zwischen Pannexin-1^{-/-} Mäusen und ihren Wildtypwurfgeschwistern (siehe Tab. 33).

Tabelle 33: Ergebnisse des Laufbandversuches II bei Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Laufbandversuch II	Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
Mausgewicht inkl Transmitter (g)	26 ± 1	31 ± 7	n.s.
Transmittergewicht in % des Mausgewichts	7,1 ± 0,4	6,3 ± 1,6	n.s.
gelaufene Distanz (m)	259 ± 25	252 ± 27	n.s.
Endgeschwindigkeit (m/min)	15 ± 2	15 ± 2	n.s.
Anzahl (n)	7	7	

Da das Laufbandprotokoll mit Steigung nur wenige Tage nach dem ersten Laufbandversuch durchgeführt wurde, waren keine großen Veränderungen bezüglich Mäusegewichten und Transmittergewichten in Relation zu Mäusegewichten zu erwarten. Demnach waren die Startbedingungen identisch.

3.5.4.1 Herzfrequenzen vor, während und nach dem Laufband II mit Steigung

Erwartungsgemäß führte auch die Ergometrie auf dem Laufband mit Steigung bei beiden Pannexin-1-Genotypen zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Ruhefrequenz vor dem Laufen (siehe Tab. 34). Die durchschnittlichen Herzfrequenzen vor und während des Laufens, sowie in der Erholungsphase waren bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen gleich (siehe Tab. 36).

Tabelle 34: Telemetrisch ermittelte Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen vor und während des Laufbandversuches mit Steigung

LB II	HF vor LB II	Max HF LB II	Anzahl	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	723 ± 54	802 ± 16	n=7	**p = 0,004
Pannexin-1 ^{-/-}	758 ± 11	790 ± 10	n=7	***p < 0,0001

3.5.4.2 Rhythmusstörungen während des Laufens auf dem Laufband mit Steigung

Weder bei Pannexin-1-Wildtypen, noch bei Pannexin-1-defizienten Mäusen kam es während der körperlichen Belastung auf dem Laufband mit integrierter Steigung zu Herzrhythmusstörungen.

3.5.5 Vergleich der Ergebnisse beider Laufbandprotokolle

Beim Vergleich beider Protokolle zeigte sich wie erwartet, dass die körperlich vermutlich weniger anstrengende Ergometrie auf dem Laufband I ohne Steigung bei beiden Pannexin-1-Genotypen zu deutlich höheren Enddistanzen und –Geschwindigkeiten führte (siehe Tab 35).

Tabelle 35: Vergleich beider Laufbandversuche bezüglich gelaufener Distanz und Endgeschwindigkeit

Vergleich der Laufbandprotokolle	Laufband I Pannexin-1 ^{+/+}	Laufband II Pannexin-1 ^{+/+}	Signifikanz	Laufband I Pannexin-1 ^{-/-}	Laufband II Pannexin-1 ^{-/-}	Signifikanz
gelaufene Distanz (m)	360 ± 97	259 ± 65	**p = 0,007	377 ± 101	252 ± 71	n.s.
Endgeschwindigkeit (m/min)	18 ± 3	15 ± 2	*p = 0,02	18 ± 2	15 ± 2	*p = 0,04
Anzahl (n)	7	7		7	7	

3.5.5.1 Vergleich der mittleren Herzfrequenzen vor, während und nach allen Belastungsuntersuchungen

Verglich man die Herzfrequenzen bei den einzelnen Belastungsversuchen miteinander, zeigten beide Pannexin-1-Genotypen vor den Schwimmversuchen signifikant niedrigere Werte, als vor beiden Laufbandversuchen (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36: Durchschnittliche Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen vor dem Schwimmen und der Laufbandergometrie

Mittlere Herzfrequenzen vor körperlicher Belastung			
HF (bpm)	LB I	LB II	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	669 ± 90	723 ± 54	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	753 ± 39	758 ± 11	n.s.
HF (bpm)	LB I	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	669 ± 90	623 ± 108	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	753 ± 39	685 ± 82	n.s.
HF (bpm)	LB II	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	723 ± 54	623 ± 108	*p=0,04
Pannexin-1 ^{-/-}	758 ± 11	685 ± 82	*p=0,04

Während des Schwimmens blieb die durchschnittliche Herzfrequenz beider Pannexin-1-Genotypen unter der bei den Laufbandversuchen erreichten. Die maximale Herzfrequenz war bei beiden Laufbandprotokollen gleich (siehe Tabelle 38).

Tabelle 37: Durchschnittliche Herzfrequenzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen während des Schwimmens und der Laufbandergometrie

Mittlere Herzfrequenzen während körperlicher Belastung			
HF (bpm)	LB I	LB II	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	782 ± 12	782 ± 23	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	776 ± 17	777 ± 12	n.s.
HF (bpm)	LB I	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	782 ± 12	728 ± 51	*p=0,01
Pannexin-1 ^{-/-}	776 ± 17	725 ± 51	*p=0,04
HF (bpm)	LB II	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	782 ± 23	728 ± 51	*p=0,02
Pannexin-1 ^{-/-}	777 ± 17	725 ± 51	*p=0,04

3.5.5.2 Vergleich maximaler Herzfrequenzen während körperlicher Belastung

Beide Pannexin-1-Genotypen erreichten während körperlicher Belastung beim Schwimmen, oder Laufbandlaufen ähnliche maximale Herzfrequenzen. Lediglich während der Bewältigung des Laufbandes ohne Steigung zeigte sich ein Unterschied- so waren die maximalen Herzfrequenzen der Pannexin-1-defizienten Tiere hier signifikant höher, als die ihrer Wildtypwurfgeschwister (siehe Tabellen 38 und 39).

Tabelle 38: Maximal erreichte Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen während des Schwimmens und der Laufbandergometrie

Maximale Herzfrequenzen während körperlicher Belastung					
HF (bpm)	Pannexin-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
SV	774 ± 37	11	792 ± 15	6	n.s.
LB I	809 ± 12	7	790 ± 15	6	*p = 0,024
LB II	802 ± 16	7	790 ± 10	6	n.s.

Tabelle 39: Maximal erreichte Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen bei allen Belastungsformen

Maximale Herzfrequenzen während körperlicher Belastung			
HF (bpm)	LB I	LB II	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	809 ± 12	802 ± 16	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	790 ± 15	790 ± 10	n.s.
HF (bpm)	LB I	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	809 ± 12	774 ± 37	p = 0,03
Pannexin-1 ^{-/-}	790 ± 15	792 ± 15	n.s.
HF (bpm)	LB II	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	802 ± 16	774 ± 37	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	790 ± 10	792 ± 15	n.s.

Vergleicht man die maximal erreichten Herzfrequenzen aller Belastungsversuche, zeigt sich lediglich ein statistisch auffallender Unterschied: So erreichen Pannexin-1^{+/+}-Mäuse auf dem Laufband ohne Steigung deutlich höhere maximale Herzfrequenzen, als beim Schwimmen (siehe Tabelle 39).

3.5.5.3 Vergleich der Herzfrequenzen von Pannexin-1^{+/+} und Pannexin-1^{-/-}-Mäusen in der Erholungsphase

Tabelle 40: Mittlere Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen in der Erholungsphase aller Belastungsformen

Mittlere Herzfrequenzen nach körperlicher Belastung			
HF (bpm)	LB I	LB II	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	741 ± 56	679 ± 115	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	686 ± 52	687 ± 77	n.s.
HF (bpm)	LB I	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	741 ± 56	729 ± 26	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	686 ± 52	711 ± 42	n.s.
HF (bpm)	LB II	SV	Signifikanz
Pannexin-1 ^{+/+}	679 ± 115	729 ± 26	n.s.
Pannexin-1 ^{-/-}	687 ± 77	711 ± 42	n.s.

In der Erholungsphase unterschieden sich die Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen bei allen drei Belastungsformen nicht signifikant voneinander (siehe Tab. 40).

Tabelle 41: Überblick über die Herzfrequenzentwicklung vor und nach körperlicher Betätigung bei beiden Pannexin-1-Genotypen

Mittlere HF		Pannexin-1 ^{+/+}	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)		Signifikanz
SV	Vor	629 ± 101	650 ± 98	13	7	n.s.
	Während	728 ± 51	725 ± 51	13	7	n.s.
	Danach	729 ± 26	711 ± 42	13	7	n.s.
LB I	Vor	669 ± 90	753 ± 39	7	7	*p = 0,04
	Während	782 ± 12	776 ± 17	7	6	n.s.
	Danach	741 ± 56	686 ± 52	7	7	n.s.
LB II	Vor	723 ± 54	758 ± 11	7	7	n.s.
	Während	782 ± 23	777 ± 12	7	6	n.s.
	Danach	679 ± 115	687 ± 77	7	7	n.s.

3.6 Echokardiographie bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Da nicht bei jeder Maus alle Einzelmessungen auszuwerten waren, weicht die Anzahl der Werte verschiedener Parameter voneinander ab (siehe Tab. 42).

Tabelle 42: Echokardiographisch ermittelte Messwerte von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen

Echokardiographie	Pannexin-1 ^{+/+}	Anzahl (n)	Pannexin-1 ^{-/-}	Anzahl (n)	Signifikanz
IVS _d (mm)	0,54 ± 0,14	14	0,58 ± 0,13	11	n.s.
IVS _s (mm)	0,59 ± 0,15	14	0,62 ± 0,15	12	n.s.
LVID _d (mm)	4,01 ± 0,45	14	4,27 ± 0,62	12	n.s.
LVID _s (mm)	2,87 ± 0,53	14	2,89 ± 0,62	12	n.s.
LVPW _d (mm)	0,62 ± 0,15	14	0,63 ± 0,19	12	n.s.
LVPW _s (mm)	0,74 ± 0,23	14	0,80 ± 0,24	12	n.s.
FS (%)	29,0 ± 8,8	13	32,6 ± 9,2	12	n.s.
EF (%)	65,5 ± 9,6	11	65,9 ± 11,4	9	n.s.
CO	20,3 ± 3,2	11	17,7 ± 4,0	9	n.s.
FAC (%)	54,0 ± 16,2	12	51,9 ± 18,9	13	n.s.
SV*	46,6 ± 10,2	10	41,0 ± 10,7	10	n.s.
Vol _d	69,4 ± 15,2	13	65,6 ± 19,0	10	n.s.
Vol _s	24,7 ± 8,8	10	26,2 ± 12,4	9	n.s.
LV Masse (mg)	79,9 ± 25,8	13	92,2 ± 20,5	11	n.s.
Korr LV Masse (mg)	63,9 ± 20,6	13	73,8 ± 16,4	11	n.s.
AV Peak (mm/s)	517,8 ± 94,6	10	478,0 ± 100,9	10	n.s.
MV E (mm/s)	545,2 ± 211,6	10	558,2 ± 121	8	n.s.

Das Ergebnis der Herzultraschalluntersuchung zeigte zwischen beiden Pannexin-1-Genotypen weder strukturelle Unterschiede im Herzaufbau, noch in seiner Verkürzungs- und Ejektionsfraktion, oder der errechneten linksventrikulären Herzmasse. Alle Messparameter waren zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Während der Untersuchung kam es bei keinem Tier zu Herzrhythmusstörungen. Einzig auffällig waren während der Echokardiographie immer wiederkehrende AV-Blockierungen- allerdings ausschließlich bei Pannexin-1^{-/-}-Mäusen. Diese wurden bei der EKG- und Langzeit-EKG-Analyse genauer betrachtet.

3.7 Herzfrequenz-turbulenz (HRT) bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Die ventrikuläre Reizschwelle lag mit 2000-2500mV ähnlich hoch wie bei der Elektrophysiologischen Untersuchung.

3.7.1 Vergleich des Turbulence Onset (TO) beider TASK-1-Genotypen

Das Turbulence Onset war bei TASK-1-Wildtypen innerhalb der ersten 7 Schläge nach der Extrasystole negativ. TASK-1-defiziente Tiere dagegen erreichten im Durchschnitt bei den ersten 7 Herzschlägen nach der ventrikulären Extrasystole positive TOs (siehe Tabelle 43 und Abbildung 3.27).

Tabelle 43: Mittelwerte des TO beider TASK-1-Genotypen bei allen Vorzeitigkeiten

TO ¹	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
RR ₁ + RR ₂	-0,34 ± 1,5	0,91 ± 2,1	**p = 0,007
RR ₂ + RR ₃	-0,82 ± 1,6	0,56 ± 1,8	**p = 0,002
RR ₃ + RR ₄	-0,70 ± 1,5	0,29 ± 1,3	**p = 0,004
RR ₄ + RR ₅	-0,65 ± 1,3	0,20 ± 1,1	**p = 0,004
RR ₅ + RR ₆	-0,52 ± 1,3	0,10 ± 1,1	*p = 0,02
RR ₆ + RR ₇	-0,28 ± 1,2	0,08 ± 1,1	n.s.
Anzahl (n)	27	31	

$$\text{TO (\%)} = \text{TO}^1 - (\text{RR}_{-2} + \text{RR}_{-1}) / (\text{RR}_{-2} + \text{RR}_{-1}) \times 100$$

Graphisch dargestellt wird der Unterschied sogar noch deutlicher:

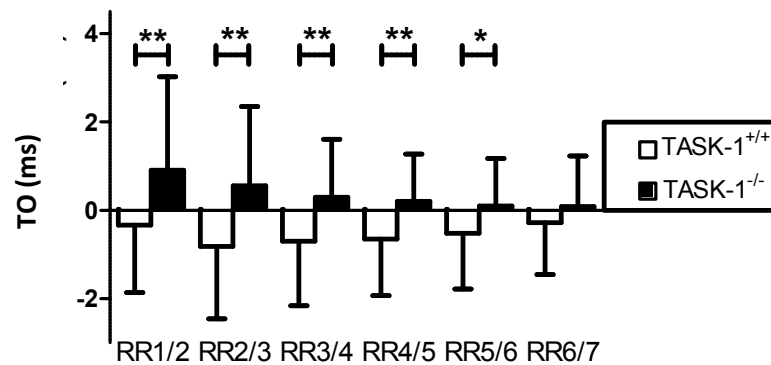


Abbildung 3.27: Vergleichende Darstellung der TO-Werte bei TASK-1 WT- und KO- Mäusen
Modifiziert nach Petric et al., 2012

Während das TO der TASK-1-Wildtypen bei allen 6. Intervallen negativ und damit physiologisch ist, zeigen TASK-1-KO-Mäuse stets positive und damit pathologische TOs.

3.7.2 Vergleich des Turbulence Slope (TS) beider TASK-1-Genotypen

Bei TASK-1 WT- und KO- Mäusen war das höchste, maximale TS zwischen TS 6 und TS 7 zu finden (siehe Tabelle 44), also zwischen dem 6. und 11. Herzschlag nach der VES.

Tabelle 44: Auftreten des positivsten TS bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen

Auftreten des TS Maximum	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
TS Maximum	5,9 ± 3,3	6,6 ± 3,3	n.s.
Anzahl (n)	29	31	

Bildete man aus allen maximalen TS-Werten einen Mittelwert je Genotyp, ergab sich zwischen TASK-1^{+/+} - und TASK-1-defizienten Mäusen kein statistischer Unterschied (siehe Tabelle 45).

Tabelle 45: Vergleich der TS-Werte bei TASK-1-Mäusen

Vergleich der TS-Werte	TASK-1 ^{+/+}	TASK-1 ^{-/-}	Signifikanz
TS	0,55 ± 0,61	0,65 ± 0,73	n.s.
Anzahl (n)	29	31	

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Untersuchungsergebnisse von Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Unserem Wissen nach wurden über Mäuse mit einer Pannexin-1-Defizienz bisher noch keine das Herz betreffenden Ergebnisse veröffentlicht. Unsere Untersuchungen ergeben demnach folgende neue Erkenntnisse:

- 1) Eine Pannexin-1-Defizienz beeinflusst nicht die anthropometrischen Daten wie Herzgewicht, Körpergewicht und Tibiallänge.
- 2) Das Fehlen von Pannexin-1 führt zu keinen Abweichungen in der Herzmorphologie oder Herzfunktion, wie histopathologisch bzw. echokardiographisch evaluiert wurde.
- 3) Die Pannexin-1-Defizienz erhöht das Auftreten von AV- Blöcken.
- 4) In Oberflächen- und telemetrisch abgeleiteten EKGs verlängert das Fehlen von Pannexin-1 signifikant die QT- und QTc- Zeiten bei wachen und narkotisierten Mäusen.
- 5) Die Pannexin-1-Defizienz führt nach intrakardialer Burststimulation zu Vorhofflimmern.

4.1.1 Anthropometrische Daten der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse

Dass hinsichtlich der Herz- und Mausgewichte zwischen beiden Pannexin-1-Genotypen keine Unterschiede bestehen, wurde bereits publiziert (Aller et al., 2005; Dvorianchikova et al., 2012). Auch unsere, sich aus der Einberechnung der Tibialängen ergebenden Quotienten bestätigen, dass alle Tiere beispielsweise bei den Belastungsversuchen gleiche Startbedingungen hatten. Sämtliche Tiere waren zum Zeitpunkt ihres Todes älter als 70 Lebensstage, sodass die Tibiaknochenlänge keinen Schwankungen mehr unterlag (Tiemann et al., 2003). Obwohl Pannexin-1 ubiquitär in der Maus vorkommt (Barbe et al., 2006), äußert sich sein Fehlen also nicht erkennbar im Körper-oder Herzaufbau.

4.1.2 Histopathologische Untersuchungen an Herzen von Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

In den letzten Jahrzehnten konnten zahlreiche Mutationen in einzelnen Genen des Herzens als ursächlich für Kardiomyopathien identifiziert werden. Daher wurde auch in unseren Untersuchungen die Auswirkung des fehlenden Pannexin-1 Gens auf die Myokardstruktur analysiert. In der Histopathologie zeigen sich bei Kardiomyopathien beispielsweise neben Verdickungen der linken Ventrikelwände Disarrays und Hypertrophien der Myozyten und Fibrosen (Alcalai et al., 2008). Besonders letztere gelten als ein Risikofaktor für Vorhofflimmern (Verheule et al., 2004; Olgin und Verheule, 2002). In unseren histologischen Analysen konnten weder in den Vorhöfen, noch in den Ventrikeln Fibrosen entdeckt werden, die als Ursache für die atrialen Tachykardien bei Pannexin-1-defizienten Mäusen in Betracht kämen.

Die Herzen der Pannexin-1-defizienten Mäuse weisen nach echokardiographischen und histopathologischen Untersuchungen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern demnach keine strukturellen Veränderungen auf.

4.1.3 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die Anzahl der Mäuse, bei denen die jeweiligen Zeiten gemessen werden konnten, weicht voneinander ab, was sich dadurch erklärt, dass die Herzfrequenz einiger Tiere höher ist, als die stimulierte Frequenz.

4.1.3.1 Vergleichende Quantifizierung von AV-Blöcken

Das gehäufte Auftreten von AV-Blöcken 2. Grades bei Pannexin-1-defizienten Mäusen sowohl im Langzeit-EKG, als auch qualitativ bei der EPU, beweist eine verzögerte AV-Knoten-Überleitung und kann Ausdruck einer erhöhten Vagotonie sein. Letzteres konnte allerdings bei der im Anschluss an unsere Versuche durchgeführten HRV-Analyse von

unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Petric et al., 2016). Gleichzeitig unterscheidet sich weder die atriale Depolarisation im Telemetrie- und Oberflächen-EKG, noch die AV-Überleitungszeit beider Pannexin-1-Genotypen in der EPU voneinander. Die zeitweise auftretenden AV-Blöcke weisen also eher darauf hin, dass Pannexin-1 möglicherweise eine funktionale Rolle bei der Impulsweitergabe spielt (Petric et al., 2016) und sein Fehlen diese Weiterleitung verzögert. Ob Pannexin-1 besonders im Reizleitungssystem exprimiert wird und seine Defizienz aus diesem Grund bei Knock-Out-Mäusen zu einer verzögerten Impulsweiterleitung führt, konnte aufgrund der zum Zeitpunkt der Untersuchungen fehlenden spezifischen Antikörper nicht weiter beleuchtet werden. So zeigten unter unseren Untersuchungsbedingungen beide Genotypen sowohl im Western Blot, als auch der Immunfluoreszenz ein Signal. Die exakten Mechanismen, die zu einer höheren Anzahl von AV-Blöcken bei Pannexin-1-defizienten Mäusen führen, können demnach noch nicht geklärt werden.

4.1.3.2 Atriale Tachyarrhythmien bei Pannexin-1-defizienten Mäusen

Entgegen der früher geltenden Behauptung, beim Mäuseherzen könne aufgrund seiner fehlenden kritischen Masse keine atriale Tachykardie ausgelöst werden (Wakimoto et al., 2001; Garrey 1914; Janse und Rosen, 2006), gibt es mittlerweile einige Publikationen, bei denen dies mittels transösophagealer Stimulation gelang (vergleiche Hagendorff et al., 1999; Verheule et al., 2004; Guasch et al., 2013).

Auch bei 7 von 8 unserer Pannexin-1-defizienten Mäuse und keiner einzigen Wildtypmaus kommt es nach atrialer Burststimulation zu wiederholt auftretenden atrialen Tachyarrhythmien. Alle konvertieren spontan wieder in den Sinusrhythmus, wie bereits in anderen Fällen beschrieben (London, 2001).

Dies weist darauf hin, dass eine Pannexin-1-Defizienz die Disposition für Vorhofflimmern nach atrialer Stimulation erhöht. Bei höheren Herzfrequenzen, wie beispielsweise bei körperlicher Belastung oder nach Isoprenalinstimulation, kann dagegen kein Vorhofflimmern nachgewiesen werden. Möglicherweise wird die Funktion von Pannexin-

1 bei höheren Herzfrequenzen von anderen Ionenkanälen zumindest teilweise kompensiert.

Während sich die atriale Tachyarrhythmie lediglich bei Pannexin-1-defizienten Mäusen zeigt, unterscheidet sich die ventrikuläre Vulnerabilität zwischen beiden Genotypen nicht. Pannexin-1 scheint demnach an der Reizweiterleitung im AV-Knoten beteiligt zu sein, zudem erhöht sein Fehlen offensichtlich das Risiko einer stimulationsinduzierten atrialen Tachyarrhythmie (Petric et al., 2016).

Beim Menschen ist Vorhofflimmern die am häufigste auftretende Arrhythmie (Chug et al., 2014). Sie entwickelt sich zum einen oft sekundär aus anderen Krankheiten, zum anderen gibt es aber immer mehr Hinweise auf genetische Prädispositionen. So wurden bereits „Risikobereiche“ an verschiedenen Stellen im Genom identifiziert (Christophersen und Ellinor, 2015) und mehrere Mausmodelle für Vorhofflimmern charakterisiert, die die unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathomechanismen untersuchen (Riley et al., 2012). Dabei ist die atriale Tachyarrhythmie lediglich eine gemeinsame klinische Ausprägung verschiedener Mutationen, die beispielsweise die Ionenkanaldynamik, Calciumhomöostase, oder die Regulation von Transkriptionsfaktoren verändern (Riley et al., 2012).

Die elektrophysiologische Grundlage für atriale Arrhythmien bei Kalium- oder Natriumkanalmutationen ist eine Verkürzung oder Verlängerung des atrialen Aktionspotentials (Tucker und Ellinor, 2014). In unserem Fall unterscheiden sich die atrialen Refraktärperioden der Pannexin-1-defizienten Mäuse allerdings nicht von denen ihrer Wildtypgeschwister.

Atriale Tachyarrhythmien zeigen sich ausschließlich bei Pannexin-1-KO-Mäusen. Dass das Fehlen eines einzelnen Gens die Suszeptibilität für Vorhofflimmern erhöht, wurde bereits durch Studien mit Connexin-40^{-/-}-Mäusen mittels transösophagealer atrialer Burststimulation nachgewiesen (Hagendorff et al., 1999).

Verheule et al. (2004) konnten ebenfalls mit transösophagealer Burststimulation bei 48% ihrer MHC-TGFcys³³ser-transgenen Mäuse, einem Mausmodell mit kardialer

Überexpression einer aktiven Form des TGF- β 1 (Details s. Nakajima et al., 2000), Vorhofflimmern auslösen, während es bei keiner einzigen Wildtypmaus gelang.

Während der Langzeit-EKGs treten bei Pannexin-1-Mäusen beider Genotypen keinerlei atriale Tachyarrhythmien auf. Auch in der Literatur ist dies ebenfalls nur sehr selten oder nie der Fall (vergl. Guasch et al., 2013); Arrhythmien können aber trotzdem häufig unter Narkose oder durch Pacingversuche verursacht werden (Guasch et al., 2013; Riley et al., 2012). Dies bedeutet also, dass in solchen Fällen und dementsprechend auch bei unseren Pannexin-1-defizienten Mäusen zwar eine Tendenz zum Flimmern oder atrialen Arrhythmien besteht, diese aber ohne Trigger lebenslang unentdeckt bleiben kann (Riley et al., 2012).

Als allgemeine Risikofaktoren für Vorhofflimmern gelten neben Fibrosen (Guasch et al., 2013; Verheule et al., 2004; Iwasaki et al., 2011) und einem Ionenkanalremodelling (Iwasaki et al., 2011), auch ein beeinträchtigter Ca^{2+} -Transport (Iwasaki et al., 2011), eine atriale Dilatation und ein erhöhter Vagustonus (Guasch et al., 2013). Histopathologisch konnten wir bei Herzen von Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen weder Fibrosen nachweisen, noch fielen Pannexin-1-defiziente Tiere echokardiographisch durch dilatierte Herzvorhöfe auf.

Weil Pannexin-1 an der Freisetzung von Calcium aus dem ER beteiligt ist und es gleichzeitig durch diese Freisetzung auch selbst aktiviert wird, sofern es als nonselektiver Kationenkanal auf der Zellmembran von Kardiomyozyten exprimiert wird (Vanden Abeele et al., 2006; Kienitz et al., 2011), könnte das Vorhofflimmern auch durch eine veränderte Calciumweitergabe und Homöostase aufgrund der Pannexin-1-Defizienz hervorgerufen werden.

Eine andere Erklärung ist folgende: Pannexin-1 könnte die fetale Herzentwicklung beeinflussen, sodass sich durch seine Inaktivierung sekundäre Veränderungen beispielsweise der Expression oder Funktion anderer Ionenkanäle ergeben, die das Risiko für atriale Tachyarrhythmien erhöhen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die molekularen Mechanismen, die bei Pannexin-1-defizienten Tieren zu Vorhofflimmern führen, noch nicht definiert und Gegenstand zukünftiger Analysen.

4.1.4 Echokardiographie bei Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen

Die Messergebnisse der Echokardiographie sind in guter Übereinstimmung mit den bislang für C57Bl/6-Mäuse publizierten Daten (vergl. Kiper et al., 2013; Liu et al., 2012; Donner et al., 2010; Rottmann et al., 2007) und unterscheiden sich auch nicht signifikant von anderen Mausstämmen (Collins et al., 2001; Yang et al., 1999).

Wie viele andere Arbeitsgruppen auch (vergl. Kiper et al., 2013; Liu et al., 2012; Donner et al., 2010; Collins et al., 2001), nutzten wir Isofluran zur Immobilisation der Mäuse während der Untersuchung. Dabei ist es nötig, die Untersuchung erst nach einer Stabilisierung der Herzfrequenz bei 400-500 Schlägen pro Minute zu beginnen (Liu et al., 2012).

Im Vergleich zu anderen Narkotika wie Avertin® oder Barbituraten, erhält man mit Isofluran bei der Echokardiographie jedoch die stabilste Verkürzungsfraction und am besten reproduzierbare Werte (Collins et al., 2003). Es gibt Arbeitsgruppen, die ihre Tiere darauf trainieren, eine echokardiographische Untersuchung ohne Sedierung über sich ergehen zu lassen (vergl. Rottmann et al., 2007; Yang et al., 1999). Allerdings erfordert das viel Übung (Collins et al., 2003), ist dadurch sehr zeitaufwändig und wird nur sehr selten beschrieben. Da die Echokardiographie lediglich einen kleinen Teil unserer Untersuchungen an Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen ausmacht und sie in der Literatur trotz der dadurch entstehenden Veränderungen überwiegend unter Narkose stattfindet (Kiper et al., 2013; Donner et al., 2010; Collins et al., 2001; Liu et al., 2012; Gardin et al., 1995; Yang et al., 1999; Hoit et al., 1995; Pollick et al., 1995; Tanaka et al., 1996), sahen wir davon ab, unsere Tiere zu trainieren.

Zur Berechnung der linksventrikulären Herzmasse nutzten wir die Flächen-Längen-Methode in der prästernalen langen Achse, die beim Menschen und der Maus zu besten Ergebnissen führt (Collins et al., 2001; Devereux et al., 1986). Die alternative transthorakale 2D-M-Mode-Methode berechnet die linksventrikuläre Masse nur aus Bildern einer Ebene und ist deshalb fehleranfälliger (Collins et al., 2001).

Alternativ lässt sich die linksventrikuläre Herzmasse durch eine MRT- oder CT-Untersuchung recht akkurat bestimmen (Collins et al., 2001; Collins et al., 2003; Wiesmann et al., 2000). Das MRT ist - wie auch die Echokardiographie - eine leicht reproduzierbare Methode (Wiesmann et al., 2000) und heute in der Humanmedizin der

Goldstandard für die Messung vieler Parameter der Herzfunktion und –morphologie. Für die Untersuchung an Mäusen ist das Vorhandensein eines MRT-Geräts mit hoher Feldstärke (7 Tesla) eine Grundvoraussetzung.

Da weder bei der histopathologischen, noch der echokardiographischen Untersuchung Anhaltspunkte für eine muskuläre Hypertrophie oder eine Funktionsstörung vorlagen, verzichteten wir auf eine weitere Diagnostik in diesem Bereich.

4.2 Diskussion der Untersuchungsergebnisse von TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} - Mäusen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den kardialen Phänotyp von TASK-1^{-/-} -Mäusen basierend auf Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Donner et al. 2010) und unter Kenntnis der TASK-1 Funktion an anderen Organen näher zu charakterisieren.

4.2.1 Heart Rate Turbulence bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen

Das Turbulence Onset der TASK-1-Wildtypen ist in den ersten 6 Herzschlägen nach der VES stets negativ, also erhöht sich die Herzfrequenz nach einer ventrikulären Extrasystole. Dies entspricht dem physiologischen Muster beim Menschen (Bauer et al., 2008; Schmidt et al., 1999) und beschreibt einen intakten Baroreflex. Bei TASK-1-defizienten Mäusen hingegen ist das TO durchgehend positiv; bei ihnen kommt es also nicht zu einer Herzfrequenzerhöhung, sondern sogar zu einem initialen Herzfrequenzabfall. Nimmt man das HRT-Muster des Menschen als Grundlage, spricht das veränderte TO bei TASK-1^{-/-} -Mäusen für eine reduzierte Baroreflexsensibilität. Die autonome kardiale Regulation ist folglich gestört.

Dazu passt ihre herabgesetzte HRV im Langzeit-EKG (Donner et al., 2010) und auch die in der gleichen Studie durchgeführte Epinephrinprovokation zeigte einen gestörten Baroreflex. Beim isolierten Herzen an der Langendorffapparatur hingegen war die HRV beider TASK-1-Genotypen nicht verschieden (Donner et al., 2010). Dies unterstützt die Hypothese, dass die herabgesetzte HRV der TASK-1^{-/-} -Mäuse im Langzeit-EKG Folge einer gestörten autonomen Regulation ist.

Das Turbulence Slope beider Genotypen ist positiv und demnach physiologisch.

Noch ungeklärt ist, welche Auswirkung die Narkose auf das HRT-Muster hat. Bei allen Untersuchungen der HRT beim Menschen waren die Patienten entweder wach, oder wurden mit Midazolam sediert (vergl. Marine et al., 2002; Schmidt et al., 1999; Watanabe et al., 2002; Schwab et al., 2004; Lammers et al., 2006). Eine Sedation reicht allerdings bei der Maus nicht aus, um invasive elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen. Beim einzigen Vergleich zwischen der HRT wacher und mit Isofluran sedierter Tiere (vergl. Stöckigt et al., 2014) fiel das TO bei wachen Mäusen negativer aus ($-2,9 \pm 4,8\%$ statt $0,4 \pm 0,9\%$) und das TS etwas positiver ($1,4 \pm 1,3$ statt $1,0 \pm 0,4$). Die Standardabweichung ist allerdings groß und auch in diesem Fall traten spontan nur etwa 2 ventrikuläre Extrasystolen pro Maus auf (Stöckigt et al., 2014). Wie bereits erwähnt ist die Anzahl zu niedrig, um eine Aussagekraft zu haben. Bauer et al. (2008) schreiben, dass pro Proband mindestens 5 spontane VES analysiert werden sollten.

Es gibt bisher außer unserer (Petric et al., 2012) nur wenige Veröffentlichungen über die Heart Rate Turbulence bei der Maus, sodass sich über Vergleichswerte zu diesem Zeitpunkt noch nicht viel sagen lässt. Einzig Stöckigt et al. (2014) publizierten Werte bei C57Bl/6-Mäusen unter Isoflurannarkose, die als Normwerte gelten sollen. Demnach haben herzgesunde Mäuse ein durchschnittliches TO von $0,4 \pm 0,9\%$ und ein TS von $1,0 \pm 0,4$. Unsere Werte sind ähnlich, allerdings befanden sich unsere Mäuse in einer tiefen Pentobarbitalnarkose. Zur besseren Vergleichbarkeit bedarf es weiterer Publikationen zur HRT bei Mäusen unter verschiedenen Narkosen. Stöckigt et al. (2014) gehen nach ihren Untersuchungen davon aus, dass die Werte der Maus in etwa den bereits veröffentlichten Daten des Menschen entsprechen und zur Berechnung des TS ebenfalls 15 auf die ventrikuläre Extrasystole folgende RR-Abstände einbezogen werden müssen.

4.2.2 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) bei TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen

Für die EPU wählten wir als Narkotikum Avertin®, weil es sich durch seine gering kardiodepressive Wirkung auszeichnet (Patel et al., 1999; Lin et al., 2007).

Pentobarbital mieden wir, weil es durch Herabsetzen der transmuralen Dispersion im LQTS-Modell Torsades-de-pointes-Tachykardien verhindert (Shimizu et al., 1999).

Isofluran konnte aufgrund seiner nachgewiesenen Aktivierung der K2P-Kanäle (Patel et al., 1999; Lesage und Lazdunski, 2000) und der außerdem nicht ausreichenden analgetischen Wirkung nicht verwendet werden.

Die im Rahmen der EPU gemessenen AV-Überleitungszeiten sind bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen gleich und entsprechen den bei C57Bl/6-Mäusen ermittelten Werten in der Literatur (vergl. Schrickel et al., 2007). Auch bezüglich des Wenckebachpunktes und atrialer, atrio-ventrikulärer, sowie ventrikulärer Refraktärzeiten gibt es keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen und den Daten in der Literatur (vergl. Schrickel et al., 2007).

Dazu passen die Befunde von Chandler et al. (2009), nach denen im menschlichen Sinusknoten kaum TASK-1 mRNA existiert. In Vorhöfen und besonders den Ventrikeln des Menschen wird es hingegen reichlich exprimiert (Limberg et al., 2011; Donner et al., 2010; Putzke et al., 2007).

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass TASK-1 mRNA in signifikanten Mengen im Atrium und Ventrikel des Mäuseherzens gefunden wird (Kim und Gnatenco, 2001; Donner et al., 2010). Dies macht eine ausschließliche Expression von TASK-1 im Leitungssystem eher unwahrscheinlich. Trotz allem ist die zelluläre und räumliche Verbreitung des TASK-1-Gens im Mäuseherz noch nicht ganz geklärt, denn keiner der zum Zeitpunkt der Untersuchungen erhältlichen TASK-1-Antikörper war spezifisch, sodass sich auch bei TASK-1-defizienten Tieren immer ein Protein in Western Blot Analysen und der Immunfluoreszenz nachweisen ließ (Aller et al., 2005; Donner et al., 2010; Graham et al., 2006).

Vergleichend sei erwähnt, dass bei Decher et al. (2011) der Wenckebachpunkt durch die Isoflurannarkose bei TASK-1-defizienten Mäusen kürzer war. Darauf postulieren sie, dass die isofluraninduzierte Aktivierung von I_{TASK-1} die Zellen des Leitungssystems hyperpolarisiert und dadurch die Impulsweiterleitung verlangsamt wird.

Da TASK-1 als Hintergrund-Kaliumkanal zur Stabilisierung des Aktionspotentials und der Repolarisation beiträgt und TASK-1-defiziente Mäuse eine verlängerte Aktionspotentialdauer, also eine verzögerte Repolarisation aufweisen (Putzke et al., 2007; Donner et al., 2010; Decher et al., 2011), wäre denkbar, dass bei ihnen vermehrt Arrhythmien auftreten (Barbuti et al., 2002; Besana et al., 2004). Auch wurde bereits

nachgewiesen, dass TASK-1 während des Vorhofflimmerns hochreguliert wird (Barth et al., 2005).

Jedoch zeigten TASK-1-Knockoutmäuse in der Vergangenheit weder in Ruhe, noch beim Schwimmen, oder der Ergometrie eine erhöhte arrhythmogene Vulnerabilität (Donner et al., 2010) und auch in unseren Experimenten konnte eine Burstsimulation weder bei TASK-1-defizienten-, noch bei TASK-1^{+/+} - Mäusen eine atriale Tachyarrhythmie hervorrufen.

Dass die Stimulation aber durchaus in der Lage ist, Arrhythmien auszulösen, zeigt das Ergebnis der elektrophysiologischen Untersuchung bei Pannexin-1-Mäusen (siehe 3.6.7).

4.3 Diskussion der Untersuchungsergebnisse von EKG-Aufzeichnungen bei Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen

4.3.1 Herzfrequenzen unter verschiedenen Narkosen und bei wachen Mäusen

Die telemetrisch ermittelten Herzfrequenzen von Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen stimmen mit in der Literatur angegebenen telemetrisch erhobenen Herzfrequenzen von Mäusen verschiedener Mausstämme überein (vergl. Barbee et al., 1992; Bernstein et al., 2003; Desai et al., 1999; Fewell et al., 1997; Kaplan et al., 1994; Kass et al., 1998; Kramer et al., 1993; Merrill et al., 1996; Palakodeti et al., 1997; Takuma et al., 2001; Uechi et al., 1998; Weiergräber et al., 2005). Vergleichsweise langsamer, aber trotzdem noch im physiologischen Bereich, schlugen die Herzen von Pannexin-1- und TASK-1-Mäusen beider Genotypen unter Avertin®-Narkose. Dabei entsprechen die Herzfrequenzen den Angaben in der Literatur für mit Avertin® narkotisierte C57Bl/6-Mäuse (Hart et al., 2001; Roth et al., 2002; Decher et al., 2011). Weiterhin stimmen die bei der Pentobarbitalnarkose erreichten Herzfrequenzen der TASK-1^{+/+} und TASK-1^{-/-} - Mäuse mit bereits publizierten Werten überein (vergl. Liu et al., 2012; Yang et al., 1999). Die Herzfrequenzen liegen unter dem physiologischen Bereich, was für dieses Narkotikum bekannt ist (Yang et al., 1999). Die unter Isofluran erreichten Herzfrequenzen beider Mausstämme sind physiologisch und decken sich mit für C57Bl/6-Mäuse bereits publizierten Werten (vergl. Berry et al., 2009; Takuma et al., 2001; Roth et al., 2002). Überraschenderweise schlugen die Herzen der TASK-1^{+/+}-und TASK-1^{-/-}-Mäuse bei der

Isoflurannarkose schneller, als bei telemetrischer EKG-Ableitung. Dies überrascht, denn die Herzfrequenz narkotisierter Tiere liegt erfahrungsgemäß unter der wacher Mäuse (Collins et al., 2003; Liu et al., 2012; Rottmann et al., 2007; Yang et al., 1999). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die nachgewiesene Aktivierung von TASK-1, TREK-1, TASK-3 und anderen K2P-Kanälen durch Isofluran (Patel et al., 1999; Lesage et al., 2000; Decher et al., 2011). Werden alle K2P-Kanäle aktiviert, fällt die Inaktivierung von TASK-1 sicherlich nicht mehr ins Gewicht. Diese könnte bei beiden TASK-1-Genotypen zu höheren Herzfrequenzen führen, als bei wachen Mäusen und unter anderen Narkosen. Eine solche Aktivierung ist bei Pentobarbital und Avertin® nicht bekannt. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass eine TASK-1-Defizienz weder am Herzen, noch im Gehirn die Expression anderer K2P-Kanäle kompensatorisch erhöht (Donner et al., 2010; Aller et al., 2005).

Über die Tatsache, dass sich die Herzfrequenzen der Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse einzig bei der Isoflurannarkose signifikant voneinander unterscheiden, lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Möglicherweise spielt auch hier die Aktivierung von Ionenkanälen durch Isofluran eine Rolle. Alternativ könnten Unterschiede in der autonomen Herzregulation beider Genotypen ursächlich beteiligt sein. Isofluran und Avertin® verursachen zwar wie jede Narkose eine Kreislaufdepression (Rottmann et al., 2007), allerdings nur in geringem Maße (Collins et al., 2003; Rottmann et al., 2007; Yang et al., 1999; Patel et al., 1999; Lin et al., 2007), weswegen sie für die echokardiographische bzw. elektrophysiologische Untersuchung verwendet wurden.

TASK-1^{-/-}-Mäuse weisen bei allen Narkosen und der telemetrischen EKG-Ableitung (Donner et al., 2010) jeweils schnellere Herzschläge auf, als ihre Wildtypgeschwister. Dies kann auf einen erhöhten Sympathikustonus, oder einen reduzierten Baroreflex hindeuten (Petric et al., 2012). Letzteres ist naheliegend, weil es ebenfalls die reduzierte Heart Rate Variability bei TASK-1-defizienten Mäusen (Donner et al., 2010) und die veränderte Heart Rate Turbulence erklären würde.

4.3.2 Herzfrequenzen von Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen während verschiedener Belastungsuntersuchungen

Sowohl mit, als auch ohne Steigung erreichen Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse auf dem Laufband ähnliche maximale Herzfrequenzen, die vergleichbar sind mit bereits publizierten Werten (vergl. Kaese und Verheule, 2012; Donner et al., 2010).

Betrachtet man die Herzfrequenzen vor Beginn der sportlichen Betätigung, fällt auf, dass sie vor den Laufbandversuchen signifikant höher sind, als vor dem Schwimmversuch. Dies liegt unseren Erachtens nach daran, dass sich die Tiere zu Beginn der EKG-Aufzeichnung bereits auf dem Laufband befinden, damit einem gewissen Stress durch veränderte Umgebungsreize ausgesetzt sind und sich nicht wie vor dem Schwimmen in ihrer gewohnten Käfigumgebung aufhalten.

Während der Belastungsuntersuchungen auf dem Laufband erreichen Pannexin-1-Wildtypen und Pannexin-1-defiziente Mäuse gleich hohe durchschnittliche sowie maximale Herzfrequenzen, die deutlich über den beim Schwimmen erreichten liegen. Dies erklärt sich dadurch, dass Schwimmen zu einer submaximalen Belastung zählt (Kaplan et al., 1994), während durch die Ergometrie eine körperliche Ausbelastung erreicht wird (Bernstein et al., 2003). Die Erholungsphase verläuft bei beiden Pannexin-1-Genotypen und allen Belastungsversuchen gleich.

Eine Pannexin-1-Defizienz verändert also nicht die Sinusknotenfunktion, denn die Herzfrequenzen beider Pannexin-1-Genotypen unterscheiden sich weder in Ruhe, noch unter verschiedenen Narkosen, körperlicher Belastung, oder Isoprenalinstimulation signifikant voneinander.

Beim Vergleich der Endgeschwindigkeit und gelaufenen Distanz beider Laufbandprotokolle zeigt sich wie erwartet, dass die erreichte Geschwindigkeit beim Laufen ohne Steigung deutlich höher ist. Damit beeinflusst die Pannexin-1-Defizienz nicht die körperliche Leistungsfähigkeit der Mäuse bei verschiedenen Belastungsformen.

4.3.3 QT-und frequenzkorrigierte QTc-Intervalle bei wachen Mäusen und unter verschiedenen Narkosen

Die Länge des QT-Intervalls ist bei wachen und narkotisierten Pannexin-1- und TASK-1-Wildtypen weitestgehend gleich und entspricht den publizierten Werten bei C57Bl/6-Mäusen (vergl. Schrickel et al., 2002; Kreuzberg et al., 2006; Petric et al., 2016) und 129SV-Mäusen (Schrickel et al., 2007). Lediglich Isofluran führt bei Pannexin-1 WT-und KO-Mäusen zu vergleichsweise kürzeren QT-Zeiten, obwohl die Herzfrequenzen sich nicht von wachen, oder mit Avertin® sedierten Mäusen unterscheiden. Kreuzberg et al. (2006) kommen allerdings bei Cx30.2^{+/+}-Mäusen auf ähnliche Werte. Möglicherweise verhindert Isofluran eine stärkere QT-Verlängerung.

Besonders deutlich wird die Verlängerung der QT- und auch der QTc-Intervalle von wachen und narkotisierten Pannexin-1 und TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter niedrigen Herzfrequenzen: Je geringer die Herzfrequenz, desto länger die QT- beziehungsweise QTc-Zeit. Beide Mausstämme haben demnach einen klinischen Phänotyp, der dem eines LQTS3 beim Menschen ähnelt (Schwartz 1997; Schwartz et al., 2001; Petric et al., 2016). Beim LQTS3 besteht während Ruhephasen ein erhöhtes Risiko für Torsades-de-Pointes-Arrhythmien und einen plötzlichen Herztod (Petric et al., 2016). Dies könnte erklären, weshalb bei körperlicher Belastung und unter Isoprenalinstimulation bei Pannexin-1-defizienten Mäusen keinerlei Herzrhythmusstörungen auftreten. Ein verborgenes LQTS1 hingegen, das heute mit Gentests diagnostiziert wird und früher durch Belastungsuntersuchungen und Katecholamingabe demaskiert wurde (Ackerman et al., 2002; Shimizu und Antzelevitch, 2000), würde anders als LQTS2 und LQTS3 (Ackerman et al., 2002; Shimizu und Antzelevitch, 2000) zu einem paradoxen Anstieg des QT-Intervalls bei hohen Herzfrequenzen führen (Ackerman et al., 2002). Bei Pannexin-1^{-/-}- und TASK-1^{-/-}-Mäusen gibt es diese paradoxe QT-Verlängerung nicht. Aus diesem Grund und weil die QRS-Dauern beider Pannexin-1- und TASK-1-Genotypen sich bei keiner Narkose unterscheiden, verlängert das Fehlen des Pannexin-1- bzw. TASK-1-Gens bei den jeweiligen Knockoutmäusen offensichtlich die kardiale Repolarisation hauptsächlich unter Ruhebedingungen. Zu diesem Zeitpunkt kann allerdings noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob alleine die Inaktivierung von Pannexin-1 bzw. TASK-1 diese

Repolarisationsverlängerung bewirkt, oder ob auch andere Kanäle ursächlich am Phänotyp beteiligt sind.

Bei der für die Berechnung des QTc-Intervalls angewandten Korrekturformel nach Mitchell (Mitchell et al., 1998) ist als Problem bekannt, dass sich die frequenzkorrigierten QTc-Zeiten bei steigenden Herzfrequenzen verlängern (Luo et al., 2004).

Die zum Vergleich hinzugezogene Framinghamformel (Sagie et al., 1992) erzielt allerdings gleiche Ergebnisse, auch bei Betrachten der QT/QTc-Relation. Demnach ist der Effekt der stärkeren QTc-Intervall-Verlängerung bei niedrigen Herzfrequenzen keine Folge einer Überkorrektur durch die Mitchellformel, sondern ein durch das Fehlen von Pannexin-1 bzw. TASK-1 verursachter intrinsischer Phänotyp (Petric et al., 2012).

Dies bestätigt die fortwährende Gültigkeit der Korrekturformel nach Mitchell.

4.3.4 Veränderungen der QT- und QTc-Intervalle von TASK-1 und Pannexin-1 WT- und KO-Mäusen nach Isoprenalinstimulation

Dass sich bei TASK-1-defizienten Mäusen unter Isoprenalinstimulation sowohl QT- als auch frequenzkorrigierte QTc-Intervalle verkleinern, stimmt mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein, nach denen sich sonst verlängerte monophasische, an der Langendorffapparatur aufgenommene Aktionspotentiale bei TASK-1^{-/-}-Mäusen bei höheren Herzfrequenzen verkürzen (Donner et al., 2010; Petric et al., 2012). Darüber hinaus decken sich unsere Ergebnisse auch mit den Daten von Decher et al. (2011), die zeigen, dass Isoprenalin die Unterschiede der QT-, QTc- und QRS-Intervalle im Oberflächen-EKG bei TASK-1-defizienten Mäusen aufhebt (Decher et al. 2011; Petric et al., 2012).

Beide Pannexin-1-Genotypen zeigen nach Isoprenalin kaum Auffälligkeiten bezüglich ihrer QT- und QTc-Intervalle: Lediglich das QT-Intervall Pannexin-1-defizienter Mäuse verkürzt sich nach Isoprenalin, da aber die frequenzkorrigierte QTc-Zeit unverändert bleibt, ist dieses Phänomen zu vernachlässigen und möglicherweise der kleinen Stichprobenmenge geschuldet.

4.3.5 Übrige EKG-Parameter von wachen Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1^{-/-} -Mäusen und unter verschiedenen Narkosen

Bei weiteren EKG-Parametern wacher und narkotisierter Pannexin-1 WT- und KO-Mäuse wie P-Dauern, PR- und QRS-Intervallen, sowie R-Amplituden bestehen keine Unterschiede zwischen Pannexin-1^{-/-} - und Pannexin-1^{+/+} -Mäusen, sodass die genutzten Narkosemittelkonzentrationen offensichtlich keinen Effekt auf diese Parameter haben.

Untersuchungen an wachen und mit Isofluran narkotisierten C57Bl/6-Mäusen von Stöckigt et al. (2014), sowie an TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen, die ebenfalls einen genetischen C57Bl/6-Hintergrund haben (Donner et al., 2010), resultierten in vergleichbaren Werten. Dagegen zeigen unter Isofluran gemessene EKG-Werte bei Schrickel et al. (2007) und Kreuzberg et al. (2006) längere Intervalle an. Allerdings nutzten die genannten Autoren andere Mausstämmen, was eine Erklärung für die Unterschiede sein könnte.

Lediglich bei telemetrischer Ableitung differieren die P-Amplituden beider Pannexin-1-Genotypen. Allerdings fanden sich weder bei der Isofluran- oder Avertin®-Narkose Unterschiede in der P-Amplitude, noch zeigte sich im Vierkammerblick der Echokardiographie eine unterschiedliche Vorhofgröße. Auch die histopathologischen Untersuchungen ergaben keine Auffälligkeiten in der Struktur und Größe der beiden Vorhöfe. Daher ist die Ursache am ehesten in der variierenden Position der implantierten Elektroden zu sehen.

4.3.6 Übrige EKG-Parameter von TASK-1^{+/+} - und TASK-1^{-/-} -Mäusen unter verschiedenen Narkosen

Die Tatsache, dass alle übrigen EKG-Parameter wie P-, PR- und QRS-Intervalle, sowie P und R-Amplituden unter verschiedenen Narkosen vergleichbare Werte annehmen, deutet darauf hin, dass die genutzten Narkosemittelkonzentrationen keinen signifikanten Effekt auf diese EKG-Parameter haben.

Einzig auffällig ist die höhere R-Amplitude bei TASK-1^{-/-} -Tieren unter Avertin®- und Pentobarbitalnarkose. Ursache dafür könnte eine leicht veränderte Herzlage, eine Variation in der Ableitung, oder eine linksventrikuläre Herzvergrößerung sein (Bruder,

2011). Allerdings gab weder die in der Vergangenheit durchgeführte Echokardiographie, noch die histopathologische Untersuchung von TASK-1-defizienten Mäusen und ihrer Herzen Anlass zu dieser Annahme (Donner et al., 2010). Wahrscheinlicher ist, dass durch geringfügig unterschiedliches Anbringen der EKG-Elektroden die Höhe des Ausschlags verändert wurde.

QRS-, P-, und PR-Intervalle, die ebenfalls bei TASK-1 WT- und KO-Mäusen unter Ketamin/Xylazin-Narkose gemessen wurden (Donner et al., 2010), entsprechen unseren Werten. Auch Stöckigt et al. (2014) erreichen bei wachen und mit Isofluran narkotisierten C57Bl/6-Mäusen ähnliche Zeiten. QRS-, P- und PR-Intervalle sind in Publikationen von Schrickel et al. (2007) und Kreuzberg et al. (2006) länger, allerdings handelt es sich auch um andere Mausstämmen.

Decher et al. (2011) zeigen, dass das QRS-Intervall bei TASK-1^{-/-}-Mäusen unter Avertin® deutlich länger ist, als bei ihren Wildtypwurfgeschwistern und beide Werte die von uns mit Avertin® gemessenen übersteigen. Da die Narkosemenge identisch war und beide Versuchsgruppen Herzfrequenzen um 450 Schläge pro Minute aufweisen, lässt sich dieses Phänomen zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären.

4.4 Fazit unserer Untersuchungen an Pannexin-1-defizienten Mäusen

Das Fehlen des Pannexin-1-Gens führt weder zu veränderten anthropometrischen Daten, noch zu abweichender Herzfunktion und –Morphologie. Es verursacht ein verlängertes QT- und QTc-Intervall und erhöht das Auftreten von AV-Blöcken besonders bei niedrigen Herzfrequenzen. Zudem ist bei Pannexin-1-defizienten Mäusen in der elektrophysiologischen Untersuchung ein Vorhofflimmern nach Burststimulation induzierbar.

Zukünftig werden sicherlich noch weitere Untersuchungen an Pannexin-1-defizienten Mäusen stattfinden, um die Funktion des Proteins am Herzen weiter zu charakterisieren. Unsere Arbeitsgruppe plant Versuche am retrograd perfundierten Herzen an der Langendorffapparatur, Untersuchungen der Heart Rate Turbulence und Versuche nach Ischämie und Reperfusion. Noch ist kein spezifischer Antikörper bekannt, aber sobald das der Fall sein sollte, könnten auch Untersuchungen mittels konfokaler

Laserscanningmikroskopie durchgeführt werden. Interessant wäre es, an Mäusen zu forschen, deren Pannexin-1-Gen lediglich am Herzen inaktiviert ist. Denn derzeit ist noch nicht klar, welche Auswirkungen auf den gesamten Körper ein Fehlen von Pannexin-1 hat. Bedenkt man die Tatsache, dass zwischen den Pannexinproteinen der Mäuse und der Menschen eine Sequenzhomologie von bis zu 94% besteht (Penuela et al., 2009), ist es nahe liegend, die Befunde der Maus auf den Menschen zu übertragen. Unsere Ergebnisse könnten eventuell dabei helfen, die Wirkung von Pannexin-1 bei der Pathogenese von Vorhofflimmern beim Menschen zu erläutern.

4.5 Fazit unserer Untersuchungen an TASK-1-defizienten Mäusen

Zusammenfassend lässt sich durch unsere Untersuchungen sagen, dass TASK-1-defiziente Mäuse den klinischen Phänotyp einer QT-Zeit-Verlängerung besitzen und im Vergleich zu ihren Wildtypgeschwistern eine verminderte HRT und damit eine reduzierte Baroreflexsensibilität aufweisen. In der elektrophysiologischen Untersuchung neigen TASK-1^{-/-} -Mäuse weder häufiger zu Arrhythmien, noch haben sie veränderte Überleitungszeiten.

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden an zwei transgenen Mausmodellen Untersuchungen am Herzen *ex vivo* und elektrophysiologische Untersuchungen *in vivo* durchgeführt. Damit wurde ein Beitrag zur kardialen Phänotypisierung geleistet. Anhand der signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mäusegenotypen konnte zudem gezeigt werden, dass die verwendeten Methoden sensitiv und spezifisch sind.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AH	atriohisäres bzw. Atrium-His-Intervall
ARP	atriale Refraktärperiode
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikuläres Intervall
AVNRP	atrioventrikulär-nodale Refraktärperiode
AV Peak	maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
AV Peak Pressure	maximaler Blutdruck über der Aortenklappe
Bp	Basenpaar
Bpm	<i>beats per minute</i> (Schläge pro Minute)
BrS	Brugada Syndrom
Bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CL	<i>cycle length</i> (Zykluslänge)
cm	Zentimeter
CO	<i>Cardiac Output</i> (Herzleistung)
CPVT	katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
C _T	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
d	Diastole
Del	deletierte Sequenz im TASK-1
DNA/DNS	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
e	Elektrode
EF	<i>ejection fraction</i> (Ejektionsfraktion)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
et al.	(<i>lat.</i>) und andere

FAC	<i>fractional area change</i> (Flächendifferenz)
FS	<i>fractional shortening</i> (Verkürzungsfraktion)
g	Gramm
h	Stunde(n)
HF	Herzfrequenz
HV	hisventrikuläres Intervall
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRT	<i>Heart Rate Turbulence</i> (Herzfrequenzturbulenz)
HRV	<i>Heart Rate Variability</i> (Herzfrequenzvariabilität)
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositoltriphosphat
IVS	<i>Inter ventricular septum</i> (Dicke des interventrikulären Septums)
K ⁺	Kaliumion
K _{2P}	Zweiporige Kaliumkanäle
kDa	kilo Dalton (Maßeinheit für Proteingrößen)
kg	Kilogramm
KO	Knock- Out
l	Liter
lacZ	Laktose-Z-Gen
LB	Laufband
LQTS	Long-QT-Syndrom
LV	Linker Ventrikel, linksventrikulär
LVID	<i>Left ventricle inner diameter</i> (Innendurchmesser des linken Ventrikels)
LVPW	<i>Left ventricle posterior wall</i> (Hinterwand des linken Ventrikels)
LV Vol	<i>Left ventricle volume</i> (Volumen des linken Ventrikels)
MAP	Monophasisches Aktionspotential
min	Minute(n)
ml	Mililiter
mm	Milimeter
M-Mode	<i>Time-Motion-Mode</i> bei der Echokardiographie
mMol	Millimol

mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
ms	Millisekunde
m/min	Meter pro Minute
mV	Millivolt
MV E	Amplitude der mitralen E-Welle
MW	Mittelwert
n	<i>number</i> (Anzahl)
p	Primer
Panx	Pannexin (Maus)
PANX	Pannexin (Mensch)
Panx-1 ^{+/+}	Pannexin-1-Wildtyp
Panx-1 ^{-/-}	Pannexin-1-Knock-Out
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline Solution</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PR	Intervall zwischen P-Welle und R-Zacke
QRS	Intervall zwischen Q- und S-Zacke
QT	Intervall zwischen Q-Zacke und T-Welle
QTc	frequenzkorrigiertes QT-Intervall, i.d.R. nach Mitchell
RNA/RNS	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RR	Intervall zwischen benachbarten R-Zacken
s	Sekunde
s	Systole
s.	siehe
s.c.	subcutan
SCL	<i>sinus cycle length</i> (Sinuszykluslänge)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SNRT	<i>sinus node recovery time</i> (Sinusknotenerholungszeit)
SNRT _c	frequenzkorrigierte Sinusknotenerholungszeit
SV	Schwimmversuch
SV*	Schlagvolumen

Tab.	Tabelle
TASK	<i>TWIK-related acid sensitive K⁺-channel</i>
TASK-1 ^{+/+}	TASK-1-Wildtyp
TASK-1 ^{-/-}	TASK-1-Knock-Out
THIK	<i>Tandem pore domain halothane-inhibited K⁺-channel</i>
TREK	<i>TWIK-related K-channel</i>
TO	<i>Turbulence Onset</i>
TS	<i>Turbulence Slope</i>
TWIK	<i>Tandem pore domains in a weak inwardly rectifying K⁺-channel</i>
Vergl.	vergleiche
VES	ventrikuläre Extrasystole
VRP	ventrikuläre Refraktärperiode
VT	ventrikuläre Tachykardie
WBP	Wenckebachpunkt
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

6 Zusammenfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. 40 % der Todesfälle in Deutschland lassen sich darauf zurückführen. Nicht selten liegen der Erkrankung hereditäre Ursachen, wie Fehlfunktionen von Ionenkanälen des Herzmuskels, zugrunde. Für unsere Untersuchungen liegen uns zwei Mauslinien vor, bei denen jeweils ein Gen (TASK-1 bzw. Pannexin-1) ausgeschaltet ist.

TASK-1 ist einer der vier wichtigsten K²P Hintergrund-Kaliumkanäle am Herzen. Mutationen dieser Kaliumkanäle können durch Beeinflussung der kardialen Repolarisation das Risiko für Arrhythmien und den plötzlichen Herztod erhöhen. Bei der Analyse von unter Avertin®- bzw. Pentobarbitalnarkose aufgenommenen EKGs zeigt sich bei TASK-1^{-/-}-Mäusen eine signifikante Verlängerung der QT- und frequenzkorrigierten QTc-Intervalle. Einzig unter Isoflurannarkose ist bezüglich dieser Intervalle kein Unterschied zwischen beiden Genotypen erkennbar, was möglicherweise mit der Aktivierung diverser Ionenkanäle durch Isofluran in Zusammenhang steht. Untersuchungen der Heart Rate Turbulence (HRT), die als Prädiktor für den plötzlichen Herztod gilt, machen offensichtlich, dass eine TASK-1-Defizienz die HRT beeinflusst. Weiterhin führt eine elektrophysiologische Untersuchung (EPU), bei der veränderte Überleitungs- und Refraktärzeiten und Arrhythmien nach Burststimulationen aufgezeigt werden sollen, zu keinem Unterschied zwischen TASK-1^{+/+} - und TASK-1-defizienten Mäusen. Es zeigt sich also, dass TASK-1 als Hintergrund-Kaliumkanal bei der ventrikulären Repolarisation eine Rolle spielt.

Bei **Pannexin-1**, der als einziger der 3 Pannexinkanäle ubiquitär nachweisbar ist, handelt es sich um einen Hemichannel. Weder beim Vergleich anthropometrischer Daten, noch bei der histopathologischen oder echokardiographischen Untersuchung stellen sich Unterschiede zwischen Pannexin-1^{+/+} - und Pannexin-1-defizienten Mäusen dar. Die Analyse von EKGs wacher, sowie mit Isofluran und Avertin® narkotisierter Mäuse, ergibt jeweils verlängerte QT- sowie frequenzkorrigierte QTc-Intervalle bei Pannexin-1^{-/-} - Mäusen. Bei letzteren treten besonders unter niedrigen Herzfrequenzen im Langzeit-EKG vermehrt AV-Blöcke auf, die bei körperlicher Betätigung verschwinden. Bei allen Pannexin-1-defizienten Mäusen war nach einer Burststimulation Vorhofflimmern

induzierbar, während keine einzige Wildtypmaus dies zeigte. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Pannexin-1 am Herzen verschiedene elektrophysiologische Parameter, wie die De- und Repolarisation und die atriale Vulnerabilität beeinflusst.

7 Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide. 40% of the death rate in Germany can be traced back to this kind of disorder. Often, these heart diseases can have hereditary causes, like malfunctions of ion channels in the heart muscle. For our experiments, two mouse strains are available to us in which one gene (TASK-1 or Pannexin-1, respectively) has been switched off.

TASK-1 is one of the four main K^{2P} background potassium channels on the heart. By affecting cardiac repolarization, mutations of potassium channels can increase the risk of arrhythmias and sudden cardiac death. In the analysis of ECGs recorded under Avertin® and pentobarbital anaesthesia, a significant prolongation of the QT and QTc interval of TASK-1^{-/-} mice can be observed. Under isoflurane anaesthesia, no difference can be detected between the two genotypes. The reason for this may be associated with the fact that various ion channels are activated by isoflurane. Tests on Heart Rate Turbulence (HRT), which is considered to be a predictor of sudden cardiac death, show that a deficiency of TASK-1 affects HRT. Furthermore, electrophysiological studies are used to detect altered atrioventricular conduction, refractory periods and arrhythmias after burst stimulation. These studies show that there is no difference between TASK-1^{-/-} and TASK-1^{+/+} mice. From this, it can be concluded that TASK-1 acts as a background potassium channel in ventricular repolarization.

Pannexin-1 is a hemichannel. It is the only one of the three pannexin channels that can be detected ubiquitously. There were no differences between Pannexin-1^{+/+} and Pannexin-1 deficient mice when comparing their anthropometric, histopathological and echocardiographic data. After analyzing ECGs of unsedated mice relative to mice under Isofluran/Avertin® anesthesia, it can be observed that Pannexin-1^{-/-} mice have prolonged QT and QTc intervals. In Holter ECGs, particularly with low heart rates, Pannexin-1 deficient mice develop more atrioventricular blocks, which disappear during exercise. Atrial Fibrillation was inducible in all Pannexin-1 deficient mice after burst stimulation. This was not detectable in any of the wild-type mice.

Summarizing the above, it can be said that Pannexin-1 influences various electrophysiological parameters as depolarization, repolarization and atrial vulnerability on the heart.

8 Literaturverzeichnis

Ackerman MJ, Khositseth A, Tester DJ, Hejlik JB, Shen WK, Porter CB (2002):

Epinephrine-induced QT interval prolongation: A gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome.

Mayo Clin Proc 77: 413-421.

Agduhr F, Stenstrom N (1929):

The appearance of the electrocardiogram in heart lesions produced by cod liver oil treatment.

Acta Paediatr 8: 493-510.

Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE (2008):

Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics.

J Cardiovasc Electrophysiol 19 (1): 104-110.

Aller MI, Veale EL, Linden A-M, Sandu C, Schwaninger M, Evans LJ, Korpi ER, Mathie A, Wisden W, Brickley SG (2005):

Modifying the subunit composition of TASK-1 channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons.

J Neurosci 25: 11455-11467.

Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessaris N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F (2008):

ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear.

Proc Natl Acad Sci USA 105(48); 18770–18775.

Arras M (2007):

Stellungnahme des Ausschusses “Anästhesie und Analgesie” der GV-SOLAS zum Einsatz von Tribromethanol (TBE, Avertin®, E107, Renarcol®, Byk 250) bei Labortieren.

Gesellschaft für Versuchstierkunde, Ausschuss für Anaesthesie und Analgesie: 1-7.

Backx PH, Marban E (1993):

Background potassium current active during the plateau of the action potential in guinea pig ventricular myocytes.

Circ Res 72: 890-900.

Bao L, Locovei S, Dahl G (2004):

Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP.
FEBS Lett. 572: 65–68.

Bao L, Samuels S, Locovei S, Macagno E, Muller K, Dahl G (2007):

Innexins form two types of channels.
FEBS Lett 581(29): 5703-5708.

Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y (2004):

The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins.
Genomics 83(4): 706–716.

Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R (2006):

Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels.
Physiology 21: 103-114.

Barbee RW, Perry BD, Ré RN, Murgo JP (1992):

Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice.
Am J Physiol 263: R728-R733.

Barbuti A, Ishii S, Shimizu T, Robinson RB, Feinmark SJ (2002):

Block of the background K⁺ channel TASK-1 contributes to effects of platelet-activating factor.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 282: H2024-H2030.

Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwaninger M (2011):

Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration.
Proc Natl Acad Sci USA 108: 20772-20777.

Barth AS, Merk S, Arnoldi E, Zwermann L, Kloos P, Gebauer M, Steinmeyer K, Bleich M, Kääb S, Hinterseer M, Kartmann H, Kreuzer E, Dugas M, Steinbeck G, Näbauer M (2005):

Reprogramming of the human atrial transcriptome in permanent atrial fibrillation: expression of a ventricular-like genomic signature.
Circ Res 96: 1022-1029.

Bauer A, Malik M, Schmidt G, Barthel P, Bonnemeier H, Cygankiewicz I, Guzik P, Lombardi F, Müller A, Oto A, Schneider R, Watanabe M, Wichterle D, Zareba W (2008):
Heart rate turbulence: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use.

J Am Coll Cardiol 52: 1353-1365.

Bayliss DA, Sirois JE, Talley EM (2003):

The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels.

Mol Interv 3: 205-219.

Bayrhuber H (Hrsg.), Kull U (Hrsg.), Bäßler U, Hopmann J, Rüdiger W (1998):

Linder Biologie. Lehrbuch für die Oberstufe.

21. Auflage, Schroedel Verlag GmbH, Hannover.

Bazzett HC (1920):

An analysis of the time-relations of electrocardiograms.

Heart 7: 353-370.

Beckmann BM, Pfeufer A, Kääh S (2011):

Inherited cardiac arrhythmias: diagnosis, treatment and prevention.

Dtsch Arztebl Int 108(37); 623-34.

Berliner Kurier (31.03.2000):

Mitten im Unterricht: Mathe-Lehrer fiel plötzlich tot um.

Verfasser unbekannt

Online erschienen <https://www.berliner-kurier.de/mitten-im-unterricht--mathe-lehrer-fiel-ploetzlich-tot-um-17913952> Stand 06.12.2017

Bernstein D (2003):

Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease.

Physiol Genomics. 13: 217-226.

Berry CJ, Thedens DR, Light-McGroary K, Miller JD, Kutschke W, Zimmerman KA, Weiss RM (2009):

Effects of deep sedation or general anesthesia on cardiac function in mice undergoing cardiovascular magnetic resonance.

J Cardiovasc Magn Reson 11: 16.

Berul Ch (2003):

Electrophysiological phenotyping in genetically engineered mice.

Physiol Genomics 13: 207-216.

Berul CI, Aronovitz MJ, Wang PJ, Mendelsohn ME (1998):

Familial hypertrophic cardiomyopathy mice display gender differences in electrophysiological abnormalities.

J Intervent Cardiac Electrophysiol 2(1): 7-14.

Berul CI, Aronovitz MJ, Wang PJ, Mendelsohn ME (1996):

In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse.

Circulation 94(10): 2641-2648.

Besana A, Barbuti A, Tateyama MA, Symes AJ, Robinson RB, Feinmark SJ (2004):

Activation of protein kinase C ϵ inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes.

J Biol Chem 279: 33154-33160.

Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA, Best AK,

Chekeni FB, Ravichandran KS, Penuela S, Laird DW, Isakson BE (2011):

Pannexin-1 regulates α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction.

Circ Res 109: 80-85.

Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G (2007):

Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane.

J Biol Chem 282, 43: 31733-31743.

Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G (2008):

Trafficking dynamics of glycosylated Pannexin1 proteins.

Cell Commun Adhes. 15(1): 119-132.

Bockenhauer D, Zilberberg N and Goldstein SA (2001):

KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel.

Nat Neurosci 4(5): 486-491.

Bruder A (2011):

Kardiologie bei Hund und Katze.

Urban und Fischer Verlag, München.

Bruzzone R, Hormuzdi S, Barbe M, Herb A, Monyer H (2003):

Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain.

PNAS 100: 13644-13649.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft:

Versuchstierzahlen 2012, Oktober 2013.

http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/2012TierversuchszahlenGesamt.pdf;jsessionid=84738D00D7D57C672232F7641C4D9055.2_cid296?__blob=publicationFile. Stand: 23.04.2014

Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R, Sharma V, Sigg DC, Boyett MR, Dobrzynski H (2009):

Molecular architecture of the human sinus node. Insights into the function of the cardiac pacemaker.

Circulation 119: 1562-1575.

Chaves AA, Dech SJ, Nakayama T, Hamlin RL, Bauer JA, Carnes CA (2003):

Age and anesthetic effects on murine electrocardiography.

Life Sciences 72: 2401-2412.

Christophersen IE, Ellinor PT (2015):

Genetics of atrial fibrillation: from families to genomes.

J Hum Genet 2015; epub ahead of print.

Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y, McAnulty JH, Zheng Z, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL (2014):

Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a global burden of disease 2010 study.

Circulation 129: 837-847.

Clasen, Lukas (2014):

Dissertation: Elektrophysiologische Untersuchungen der TASK-1 „Knock-out“-Maus.

Fachbereich der Allgemeinen Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie,

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vaga-Saenz de Miera E, Rudy B (1999):

Molecular diversity of K⁺ channels.

Ann N Y Acad Sci 868: 233-285.

Collins KA, Korcarz CE, Lang RM (2003):

Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice.

Physiol Genomics 13: 227-239.

Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM (2001):

Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H1954-H1962.

Czirjak G, Fischer T, Spät A, Lesage F, Enyedi P (2000):

TASK (TWIK-related acid sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II.
Mol Endocrinol 14: 863-874.

Czirjak G, Petheo GL, Spät A, Enyedi P (2001):

Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C.
Am J Physiol Cell Physiol 281: C700-C708.

Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA, Barrett PQ (2008):

TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism.
Proc Natl Acad Sci USA 105: 2203-2208.

Decher N, Wemhöner K, Rinné S, Netter MF, Zuzarte M, Aller MI, Kaufmann SG, Li XT, Meuth SG, Daut J, Sachse FB, Maier SKG (2011):

Knock-out of the potassium channel TASK-1 leads to a prolonged QT interval and a disturbed QRS complex.
Cell Physiol Biochem 28: 77-86.

Delisle BP, Anson BD, Rajamani S, January CT (2004):

Biology of Cardiac Arrhythmias: Ion Channel Protein Trafficking.
Circ Res. 94: 1418-1428.

Desai KH, Schauble E, Luo W, Kranias E, Bernstein D (1999):

Phospholamban deficiency does not compromise exercise capacity.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 276:H1172-H1177.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2011):

Neuer Herzbericht: Immer weniger Deutsche sterben an einem Herzinfarkt- Sterblichkeit hängt auch vom Wohnort ab.
Presstext DGK 10/2011.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2014):

Neuer Deutscher Herzbericht. Herzmedizin-Fortschritte: Sterblichkeit nimmt weiter ab, immer bessere Versorgung.

Presstext DGK 01/2014.

Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N (1986):

Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings.

Am J Cardiol 57: 450-458.

D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G (2011):

Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum.

Cell Signal 23(2):305-316.

Doehlemann C, Murawski P, Theissen K, Haider M, Foerster C, Poepl SJ (1979):

Ventricular premature systoles causing ventriculophasic sinus arrhythmia.

Z Kardiol 68: 557-565.

Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED (1998):

Cardiovascular phenotyping in mice.

Cardiovascular Research 39: 34-49.

Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, Kontaridis MI, Sorgen PL, Sosinsky GE, Duffy HS (2012):

Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 303: H1208-H1218.

Donner B, Schullenberg M, Geduldig N, Hüning A, Mersmann J, Zacharowski K, Kovacevic A, Decking U, Aller MI, Schmidt KG (2010):

Functional role of TASK-1 in the heart: Studies in TASK-1 deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability.

Basic Res Cardiol 106: 75-87.

Ducret E, Alexopoulos H, Le Feuvre Y, Davies J, Meyrand P, Bacon JP, Fénelon VS (2006):

Innexins in the lobster stomatogastric nervous system: cloning, phylogenetic analysis, developmental changes and expression within adult identified dye and electrically coupled neurons.

Eur J Neurosci 24(11): 3119-3133.

Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M (1997):

TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH.

EMBO J 16: 5464-5471.

Dvorianchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, Shestopalov VI (2012):

Genetic ablation of pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury.

PLoS One 7(2): e31991. doi:10.1371/journal.pone.0031991.

Von Engelhardt W, Breves G (2005):

Physiologie der Haustiere. Enke Verlag Stuttgart.

European Mouse Mutant Archive:

http://strains.emmanet.org/mutant_types.php Stand 28.04.14

Fabritz L, Damke D, Emmerich M, Kaufmann SG, Theis K, Blana A, Fortmüller L, Laakmann S, Hermann S, Aleynichenko E, Steinfurt J, Volkery D, Riemann B, Kirchhefer U, Franz MR, Breithardt G, Carmeliet E, Schäfers M, Maier SKG, Carmeliet P, Kirchhof P (2010):

Autonomic modulation and antiarrhythmic therapy in a model of long QT syndrome type 3.

Cardiovasc Res 87(1): 60-72.

Fewell JG, Osinska H, Klevitsky R, Ng W, Sfyris G, Bahrehmand F, Robbins J (1997):

A treadmill exercise regimen for identifying cardiovascular phenotypes in transgenic mice.

Am J Physiol 273(3): H1595-H1605.

Frey HH, Löscher W (2002):

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.

Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA (1995):

Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice.

Circ Res 76: 907-914.

Garrey WE (1914):

The nature of fibrillary contraction of the heart: Its relation to tissue mass and form.

Am J Physiol 33: 397-414.

Graham V, Zhang H, Willis S, Creazzo TL (2006):

Expression of a two-pore domain K⁺ channel (TASK-1) in developing avian and mouse ventricular conduction systems.

Dev Dyn 235: 143-151.

Graw J (2007):

Herstellung von Knockout-Mäusen. (Nobelpreis 2007 in Medizin)

Biol. Unserer Zeit 6(37): 352-354.

Guasch E, Benito B, Qi X, Cifelli C, Naud P, Shi Y, Mighiu A, Tardif JC, Tadevosyan A, Chen Y, Gillis MA, Iwasaki YK, Dobrev D, Mont L, Heximer S, Nattel S (2013):

Atrial Fibrillation Promotion by Endurance Exercise- Demonstration and Mechanistic Exploration in an Animal Model.

Journal of the American College of Cardiology 62 (1): 68-77.

Gurney AM, Osipenko AN, McMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempf FEJ (2003):

Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells.

Circ Res 93: 957-964.

Gurney AM, Manoury B (2009):

Two-pore potassium channels in the cardiovascular system.

Eur Biophys J 38: 305-318.

Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K (1999):

Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation.

Circulation 99(11): 1508-1515.

Hart CYT, Burnett JC Jr., Redfield MM (2001):

Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 281: H1938-1945.

Havranek S, Stovicek P, Psenicka M, Wichterle D, Linhart A (2007):

Heart rate turbulence after ventricular pacing trains during programmed ventricular stimulation.

Pacing Clin Electrophysiol 30 Suppl 1: S 170-173.

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R, Barhanin J (2008):

Invalidation of TASK-1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis.

EMBO J 27: 179-187.

Hoit BD, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA (1995):

In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency.

Circ Res 77: 632-637.

Huang Y, Grinspan JB, Abrams CK, Scherer SS (2007):

Pannexin1 is expressed by neurons and glia but does not form functional Gap Junctions.

Glia. 55: 46–56.

Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DS, Scemes E (2008):

P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling.

Am J Physiol 295: C752-C760.

Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y (2011):

Pannexin 3 functions as an ER Ca²⁺ channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation.

J Cell Biol Vol 193 No 7, 1257-1274.

Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y (2010):

Pannexin 3 regulates intercellular ATP/cAMP Levels and Promotes Chondrocyte Differentiation.

J Biol Chem 285: 18948-18958.

Iwasaki Y, Nishida K, Kato T, Nattel S (2011):

Atrial Fibrillation Pathophysiology- Implications for Management.

Circulation 124: 2264-2274.

Janse MJ, Rosen MR (2006):

History of arrhythmias.

Handb Exp Pharmacol 171, 1–39.

Kaese S, Verheule S (2012):

Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size.
Frontiers Physiol 3: 1-19.

Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, Leinwand LA, Buttrick PM (1994):

Cardiac adaptations to chronic exercise in mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 267: H1167-H1173.

Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D (1998):

Murine cardiac function: a cautionary tail.
Circ Res 82: 519-522.

Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff U, Ellingsen Ø (2002):

Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy.
J Appl Physiol 93:1301-1309.

Kienitz MC, Bender K, Dermietzel R, Pott L, Zoidl G (2011):

Pannexin 1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes.
J Biol Chem 286: 290-298.

Kim D, Gnatenco C (2001):

TASK-5, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family.
Biochem Biophys Res Commun 284(4): 923-930.

Kiper C, Grimes B, Van Zant G, Satin J (2013):

Mouse strain determines cardiac growth potential.
PLoS One 8(8): e70512.doi:10.1371/journal.pone.0070512.

Kraft W (2010):

Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Hund und Katze.
5. Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart.

Kramer K (2000):

Applications and Evaluation of Radio-Telemetry in Small Laboratory Animals.
Krips Verlag, Meppel, Niederlande.

Kramer K, Voss HP, Grimbergen JA, Bast A (1998):

Circadian rhythms of heart rate, body temperature, and locomotor activity in freely moving mice measured with radio-telemetry.
Lab Animal 27 (8): 23-26.

Kramer K, van Acker S, Voss H, Grimbergen JA, van der Vijgh W, Bast A (1993):
Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice.
J Pharmacol Toxicol Methods 30(4): 209-215, 1993.

Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K (2006):
Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node.
Proc Natl Acad Sci USA 103(15): 5959-5964.

Kusunose K, Penn MS, Zhang Y, Cheng Y, Thomas JD, Marwick TH, Popović ZB(2012):
How Similar Are the Mice to Men? Between-Species Comparison of Left Ventricular Mechanics Using Strain Imaging.
PLoS One 7(6): e4461.

Lammers A, Kaemmerer H, Hollweck R, Schneider R, Barthel P, Braun S, Wacker A, Brodherr-Heberlein S, Hauser M, Eicken A, Schmidt G, Hess J (2006):
Impaired cardiac autonomic nervous activity predicts sudden cardiac death in patients with operated and unoperated congenital cardiac disease.
J Thorac Cardiovasc Surg 132(3): 647-655.

Lai CPK, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC (2007):
Tumor-suppressive effects of Pannexin 1 in C6 glioma cells.
Cancer Res 67: 1545-1554.

Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, Chavez RA, Forsayeth JR, Yost CS (1998):
An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum.
J Neurosci 18:868-877.

Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2000a):
Ionenkanalerkrankungen-allgemeine Charakteristika und Pathomechanismen.
Dt Ärztebl 97: A-1826-1831.

Lerche H, Mitrovic N, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2000b):
Ionenkanalerkrankungen- Krankheitsbilder.
Dt Ärztebl 97: A-1902-1907.

Lesage F, Lazdunski M (2000):

Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels.
Am J Physiol Renal Physiol 279: F793-F801.

Lieggi CC, Artwohl JE, Leszczynski JK, Rodriguez NA, Fickbohm BL, Fortman JD (2005):

Efficacy and safety of stored and newly prepared tribromoethanol in ICR mice.
Contemp Top Lab An Sci 44(1): 17-22.

Limberg SH, Netter MF, Rolfes C, Rinné S, Schlichthörl G, Zuzarte M, Vassiliou T,

Moosdorf R, Wulf H, Daut J, Sachse FB, Decher N (2011):

TASK-1 channels may modulate action potential duration of human atrial cardiomyocytes.
Cell Physiol Biochem 28: 613-624.

Lin M, Liu R, Gozal D, Wead WB, Chapleau MW, Wurster R, Cheng ZJ (2007):

Chronic intermittent hypoxia impairs baroreceptor control of heart rate but enhances heart rate responses to vagal efferent stimulation in anaesthetized mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H997-H1006.

Liu X, Wang X, Zhang X, Xie Y, Chen R, Chen H (2012):

C57BL/6 Mice are more appropriate than BALB/C Mice in inducing dilated cardiomyopathy with short-term doxorubicin treatment.
Acta Cardiol Sin 28: 236-240.

Locovei S, Bao L, Dahl G (2006):

Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap.
Proc Natl Acad Sci USA 103:7655-7659.

Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G (2007):

Pannexin 1 is part of the pore forming unit of the P2X₇ receptor death complex.
FEBS Lett. 581(3): 483-488.

Locovei S, Wang J, Dahl G (2006):

Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium.
FEBS Lett 580: 239-244.

Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA (2001):

Block of Kcnk3 by Protons. Evidence that 2P-domain potassium channel subunits function as homodimers.
J Biol Chem 276(27): 24449-24452.

London B (2001):

Cardiac Arrhythmias: From (Transgenic) Mice to Men.
Journal of Cardiovascular Electrophysiology 12 (9), 1089-1091.

Luo S, Michler K, Johnston P, Macfarlane PW (2004):

A comparison of commonly used QT correction formulae: the effect of heart rate on the QTc of normal ECGs.
J Electrocardiology 37: 81-90.

Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A (2009):

Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells.
J Pharmacol Exp Ther. 328 (2): 409-18.

Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E (2001):

The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K⁺ channel TASK-1.
EMBO J 20: 47-54.

Marine JE, Watanabe MA, Smith TW, Monahan KM (2002):

Effect of atropine on heart rate turbulence.
Am J Cardiol 89: 767-769.

Masset MP, Berk BC (2005):

Strain-dependent differences in responses to exercise training in inbred and hybrid mice.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R1006-R1013.

Mechmann S, Pott L (1986):

Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes.
Nature 319(6054): 597-599.

Meijler FL (1985):

Atrioventricular conduction versus heart size from mouse to whale.
J Am Coll Cardiol. 5: 363-5.

Merrill DC, Thompson MW, Carney CL, Granwehr BP, Schlager G, Robillard JE, Sigmund CD (1996):

Chronic hypertension and altered baroreflex responses in transgenic mice containing the human renin and human angiotensinogen genes.
J Clin Invest 97: 1047-1055.

Mischke K, Stellbrink C (2005):

Klinische Aspekte zum Long QT-Syndrom.

Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin; Jahrgang 56 (5): 126-130.

Mitchell GF, Jeron A, Koren G (1998):

Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse.

Am J Physiol 274: H747-751.

Myerburg RJ, Castellanos A (1997):

2 Clinical trials of implantable defibrillators.

N Engl J Med 337 (22): 1621-1623.

Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittiè AS, Dembowsky K, Jing S, Field LJ (2000):

Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor- β_1 transgene in the heart.

Circ Res 86: 571-579.

Nelson RW, Couto CG (2006):

Innere Medizin der Kleintiere.

1. Auflage, Elsevier Verlag, München.

Nerbonne JM, Nichols CG, Schwarz TL, Escande D (2001):

Genetic manipulation of cardiac K⁺ channel function in mice: What have we learned, and where do we go from here?

Circ Res 89(11): 944-956.

Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, Tsao PS, Kosek J, Bernstein D, Cooke JP (1999):

Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 276:H1346-H1354.

Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T, Kurose H (2008):

P2Y₆ receptor-G $\alpha_{12/13}$ signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis.

EMBO J 27, 3104-3115.

Olgin JE, Verheule S (2002):

Transgenic and knockout mouse models of atrial arrhythmias. Review.

Cardiovasc Res 54: 280-286.

Olschewski A, Li Y, Tang B, Hanze J, Eul B, Bohle RM, Wilhelm J, Morty RE, Brau ME, Weir K, Kwapiszewska G, Klepetko W, Seeger W, Olschewski H (2006):

Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells.

Circ Res 98: 1072-1080.

Palakodeti V, Oh S, Oh BH, Mao L, Hongo M, Peterson KL, Ross J (1997):

Force-frequency effect is a powerful determinant of myocardial contractility in the mouse.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 273: H1283-H1290.

Panchin Y (2005):

Evolution of gap junction proteins- the pannexin alternative.

Journal of experimental biology 208: 1415-1419.

Patel AJ, Honoré E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M (1999):

Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels.

Nat Neurosci 2: 422-426.

Pelegri P, Surprenant A (2009):

The P2X₇ receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1 β release.

Purinergic signaling 5: 129-137.

Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celitti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW (2007):

Pannexin 1 and Pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins.

Journal of Cell Science 120: 3772-3783.

Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW (2009):

Glycosylation regulates Pannexin intermixing and cellular localization.

Molecular Biology of the Cell 20: 4313-4323.

Petric S, Clasen L, van Weßel C, Geduldig N, Ding Z, Schullenberg M, Mersmann J, Zacharowski K, Aller MI, Schmidt KG, Donner BC (2012):

In vivo electrophysiological characterization of TASK-1 deficient mice.

Cell Physiol Biochem 30: 523-537.

Petric S, Klein S, Dannenberg L, Lahres T, Clasen L, Schmidt KG, Ding Z, Donner BC (2016):

Pannexin-1 deficient mice have an increased susceptibility for atrial fibrillation and show a QT-Prolongation phenotype.

Cell Physiol Biochem 38: 487-501.

Pollick C, Hale SL, Kloner RA (1995):

Echocardiographic and cardiac Doppler assessment of mice.
J Am Soc Echocardiogr 8: 602-610.

Popović ZB, Sun JP, Yamada H, Drinko J, Mauer K, Greenberg NL, Cheng Y, Moravec CS, Penn MS, Mazgalev TN, Thomas JD (2005):

Differences in left ventricular long-axis function from mice to humans follow allometric scaling to ventricular size.
J Physiol 568 (1): 255-265.

Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM, Di Mario C, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJJ, Zipes DP (2001):

Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology.
European Heart Journal 22: 1374-1450.

Putzke C, Wemhöner K, Sachse FB, Rinné S, Schlichthörl G, Li XT, Jae L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Müller R, Daut J, Decher N (2007):

The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle.
Cardiovasc Res 75: 59-68.

QuantiTect® Reverse Transcription Handbook. Qiagen, Hilden, 2009.

Qiu F, Dahl G (2009):

A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP.
Am J Physiol Cell Physiol 296: C250-C255.

Raj SR, Sheldon RS, Koshman M, Roach DE (2005):

Role of hypotension in heart rate turbulence physiology.
Heart Rhythm 2: 820-827.

Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R (2005):

Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system.
Eur J Neurosci 21(12): 3277-3290.

Roach D, Koshman ML, Duff H, Sheldon R (2002):

Induction of heart rate and blood pressure turbulence in the electrophysiologic laboratory.
Am J Cardiol 90: 1098-1102.

Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin ES, Ross J (2002):

Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 282: H2134-2140.

Rottman JN, Ni G, Brown M (2007):

Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice.
ECHOCARDIOGRAPHY: A Jnl. Of CV Ultrasound & Allied Tech. 24(1): 83-89.

Saba S, Janczewski AM, Baker LC, Shusterman V, Gursoy EC, Feldman AM, Salama G, McTiernan CF, London B (2005):

Atrial contractile dysfunction, fibrosis, and arrhythmias in a mouse model of cardiomyopathy secondary to cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α .
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289(4): H1456-H1467.

Sagie A, Larson MG, Goldberg RJ, Bengtson JR, Levy D (1992):

An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham heart study).
Am J Cardiol 70: 797-801.

Scemes E, Suadicani S, Dahl G, Spray DC (2007):

Connexin and pannexin mediated cell-cell communication.
Neuron Glia Biol. 3 (3): 199-208.

Schmidt G, Malik M, Barthel P, Schneider R, Ulm K, Rolnitzky L, Camm AJ, Bigger JT Jr, Schömig A (1999):

Heart rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction.
Lancet 353: 1390-1396.

Schröckel JW, Brixius K, Herr C, Clemen CS, Sasse P, Reetz K, Grohé C, Meyer R, Tiemann K, Schröder R, Bloch W, Nickenig G, Fleischmann BK, Noegel AA, Schwinger RHG, Lewalter T (2007):

Enhanced heterogeneity of myocardial conduction and severe cardiac electrical instability in annexin A7-deficient mice.
Cardiovasc Res 76: 257-268.

Schröckel JW, Bielik H, Yang A, Schimpf R, Shlevkov N, Burkhardt D, Meyer R, Grohé C, Fink K, Tiemann K, Lüderitz B, Lewalter T (2002):

Induction of atrial fibrillation in mice by rapid transesophageal atrial pacing.
Basic Res Cardiol 97(6): 452-460.

Schwab JO, Eichner G, Veit G, Schmitt H, Lewalter T, Lüderitz B (2004):

Influence of Basic Heart Rate and Sex on Heart Rate Turbulence in Healthy Subjects.
PACE 27: 1625-1631.

Schwartz PJ (1997):

The long QT syndrome.
Current Problems in Cardiology 22(6): 297-351.

Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AAM, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R (2001):

Genotype-phenotype correlation in the long QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias.
Circulation 103(1): 89-95.

Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R (2012):

Long-QT syndrome - from genetics to management.
Circ Arrhythm Electrophysiol 5: 868-877.

Schwartz PJ, Ackerman MJ, George AL, Wilde AAM (2013):

Impact of Genetics on the Clinical Management of Channelopathies.
J m Cardiol 62 (3): 169-180.

Shestopalov VI, Panchin Y (2008):

Pannexins and gap junction protein diversity.
Cell Mol Life Sci 65(3): 376-394.

Shimizu W, Antzelevitch C (2000):

Differential response to beta-adrenergic agonists and antagonists in LQT1, LQT2 and LQT3 models of the long QT syndrome.
J Am Coll Cardiol 35: 778-786.

Shimizu W, McMahon B, Antzelevitch C (1999):

Sodium pentobarbital reduces transmural dispersion of repolarization and prevents torsades de pointes in models of acquired and congenital long QT syndrome.
J Cardiovasc Electrophysiol 10: 154-164.

Shimizu W, Ohe T, Kurita T, Takaki H, Aihara N, Kamakura S, Matsuhisa M, Shimomura K (1991):

Early afterdepolarization induced by isoproterenol in patients with congenital long QT syndrome.

Circulation 84: 1915-1923.

Silbernagel S, Despopoulos A (2003):

Taschenatlas der Physiologie.

6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart.

Silverman W, Locovei S, Dahl G (2008):

Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels.

Am J Physiol Cell Physiol 295: C761-C767.

Silverman WE, de Rivero Vaccari JP, Locovei S, Qiu F, Carlsson SK, Scemes E, Keane RW, Dahl G (2009):

The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes.

J Biol Chem 284: 18143-18151.

Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C III, Bayliss DA (2000):

The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalational anesthetics.

J Neurosci 20: 6347-6354.

Statistisches Bundesamt (2014):

Gesundheit-Todesursachen in Deutschland 2012.

Fachserie 12, Reihe 4.

Stöckigt F, Pöhlmann S, Nickenig G, Schwab JO, Schrickel JW (2014):

Induced and spontaneous heart rate turbulence in mice: influence of coupling interval.

Europace 16: 1092-1098.

Swayne LA, Sorbara CD, Bennett SAL (2010):

Pannexin 2 is expressed by postnatal hippocampal neural progenitors and modulates neuronal commitment.

J Biol Chem 285 (32): 24977-24986.

Swynghedauw B, Aubert G (2003):

Molecular determinants of repolarization time.

Exp Clin Cardiol 8 (3):119-124.

Takuma S, Suehiro K, Cardinale C, Hozumi T, Yano H, Shimizu J, Mullis-Jansson S, Sciacca R, Wang J, Burkhoff D, Di Tullio MR, Homma S (2001):

Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious echocardiographic approach.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H2364-H2370.

Talley, EM, Bayliss DA (2002):

Modulation of TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) potassium channels:

Volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action.

J Biol Chem 277: 17733-17742.

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E (2004):

Pharmacology of cardiac potassium channels.

Cardiovasc Res 62(1): 9-33. Review.

Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J (1996):

Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse.

Circulation 94: 1109-1117.

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB (2003):

Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development.

Am J Physiol Heart Physiol 284 (2): H464-H474.

Tucker NR, Ellinor PT (2014):

Emerging directions in the genetics of atrial fibrillation.

Circ Res 114: 1469-1482.

Uechi M, Asai K, Osaka M, Smith A, Sato N, Wagner TE, Ishikawa Y, Hayakawa H, Vatner DE, Shannon RP, Homcy CJ, Vatner SF (1998):

Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac $G_{s\alpha}$.

Circ Res 82: 416-423.

Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N (2006):

Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1.

J Cell Biol 174: 535-546.

Verheule S, Sato T, Everett T IV, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE (2004):

Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-1.

Circ Res 94: 1458-1465.

VisualSonics: Vevo® 2100 Imaging System- Operator Manual

Wakimoto H, Maguire CT, Kovoor P, Hammer PE, Gehrman J, Friedman JK, Berul CI (2001):

Induction of atrial tachycardia and fibrillation in the mouse heart.

Cardiovasc Res 50: 463-473.

Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, Dahl G (2007):

Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters.

Am J Physiol Cell Physiol 293: C1112-C1119.

Watanabe MA, Marine JE, Sheldon R, Josephson ME (2002):

Effects of Ventricular Premature Stimulus Coupling Interval on Blood Pressure and Heart Rate Turbulence.

Circulation 106: 325-330.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, et al. (2002):

Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome.

Nature 420: 520-562.

Webb S, Brown NA, Anderson RH (1996):

The structure of the mouse heart in late fetal stages.

Anat Embryol 194(1):37-47.

Wehrens XHT, Kirchhoff S, Doevendans PA (2000):

Mouse electrocardiographie: An interval of thirty years.

Cardiovascular research 45: 231-237.

Weiergräber M, Henry M, Südkamp M, de Vivie E-R, Hescheler J, Schneider T (2005):

Ablation of Cav2.3/E-type voltage-gated calcium channel results in cardiac arrhythmia and altered autonomic control within the murine cardiovascular system.

Basic Res Cardiol 100: 1-13.

Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S (2000):

Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 278: H652-H657.

World Health Organization 2013:

The top 10 causes of death 2011. Factsheet 310. Letztes Update im Juli 2013.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.htm>. Stand 21.04.2014.

Yamamoto Y, Kummer W, Atoji Y, Suzuki Y (2002):

TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body.

Brain Res 950: 304-307.

Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA (1999):

Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 277: H1967-H1974.

9 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Petric S, Clasen L, van Weßel C, Geduldig N, Ding Z, Schullenberg M, Mersmann J, Zacharowski K, Aller MI, Schmidt KG, Donner BC (2012):

In vivo electrophysiological characterization of TASK-1 deficient mice.

Cell Physiol Biochem 30: 523-537.

Petric S, Klein S, Dannenberg L, Lahres T, Clasen L, Schmidt KG, Ding Z, Donner BC (2016):

Pannexin-1 deficient mice have an increased susceptibility for atrial fibrillation and show a QT-Prolongation phenotype.

Cell Physiol Biochem 38: 487-501.

10 Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum: _____

Unterschrift: _____

11 Danksagung

Vielen Dank, Prof. Dr. Geyer, für die wie selbstverständliche Übernahme meiner Dissertation nach dem plötzlichen Tod von Prof. Petzinger und die nette Betreuung in Gießen.

Herzlichen Dank, Frau Prof. Dr. Donner für das Überlassen des Themas, die warmherzige und intensive Betreuung während der Versuche, aber auch für angeregte Diskussionen, ausführliche Korrekturen und Ihren unermüdlichen Optimismus!

Danke, Dr. Ding, für zahllose lehrreiche Stunden im Labor. Für Ihre Geduld beim Zeigen der Präparation und Katheterimplantation für HRT- und EPU-Versuche und für das Überlassen der Geräte und Ihres Arbeitsplatzes.

Danke an Dr. Simone Gorreßen für die Einführung in die Echokardiographie bei Mäusen und das Anlernen.

Danke an Prof. Dr. Schrader für das Überlassen des Arbeitsplatzes im physiologischen Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Danke, Lukas Clasen, für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und dem physiologischen Institut. Für die gegenseitige Motivation, neue Ideen und gemeinsames Krafttanken.

Danke, Lisa Dannenberg und Tillmann Lahres für die Unterstützung beim Pannexinprojekt.

Danke, Sven Haupt von der Firma ADInstruments, für die Lösung technischer Fragen. Sie haben das Unmögliche möglich gemacht!

Danke Martina, danke Elke für die Hilfe bei allen im Labor auftretenden Schwierigkeiten, das Ausleihen mancher Substanzen und alle (auch fachfremden) Gespräche.

Danke an Prof. Dr. Sager, Dr. Engehardt und Dr. Benten für die kompetente Beratung zu Zucht- und Narkosefragen und allen anderen MitarbeiterInnen der TVA Düsseldorf für die liebevolle Pflege unserer Mäuse.

Ein großes Dankeschön gebührt meiner Familie: Für die Motivation weiter zu machen, für das Korrekturlesen und für die unendliche Hilfe bei der Formatierung. Danke Henning, danke Anni! Ihr musstet manche Stunde auf mich verzichten.

12 Anhang

Stimulationsprotokoll für die elektrophysiologische Untersuchung bei TASK-1- und Pannexin-1-Mäusen beider Genotypen

Versuchsprotokoll Maus-EPU									
Datum									
Untersucher:									
Experiment Nr.:									
Maus/Nr, Geschlecht, Gewicht									
Narkose Art, Medikament, Dosierung									
Atemfrequenz									
Bemerkungen									
Intrakardiales Elektrogramm									
	Qualität	AV	AH	HV	Zeitsignatur	Bemerkungen			
Ableitung 1/2									
Ableitung 2/3									
Ableitung 3/4	His ?								
Ableitung 4/5	His ?								
Ableitung 5/6	His ?								
Ableitung 6/7	His ?								
Ableitung 7/8									
Atrium: P7/8, S5/6, Ventrikel: P1/2, S5/6									
Atriales Stimulationsprotokoll									
Reizschwelle (RS)									
30 Stimuli	Atriale RS = ARS			Ventrikuläre RS = VRS					
	mV @ ms	A @ ms		mV @ ms	A @ ms				
CL:									
Sensing E				Sensing E					
Pacing E				Pacing E					
Bemerkungen:									
SNRT	SNRT S1S1 120 ms			SNRT S1S1 100 ms					
30 atriale Stimuli									
SCL									
MW SNRT									
MW SCL									
SNRTc (SNRT - SCL)									
SNRT/SCL x 100%									
Sensing E									
Pacing E									
Wenckebach Punkt									
8 Stimuli x CL - 20ms der SCL	Start								
Verkürzung um 2 ms	WBP								
AVNRP + ARP									
12 atriale Stimuli S1				S1S1 120 ms		S1S1 110 ms		S1S1 100 ms	
S2 - 10 ms von CL				Start		Start		Start	
reduzieren um 10ms bis Überleitung ausfällt, dann auf 2 ms genau bestimmen = AVNRT				AVNRP		AVNRP		AVNRP	
reduzieren um 10ms bis Vorhoferregung ausfällt,				ARP		ARP		ARP	
Sensing E									
Pacing E									
Atriale Burst Stimulation zum Auslösen von AF									
5 s Dauer	2x Reizschwelle	4x Reizschwelle							
50 ms / 100 Stimuli									
40 ms / 125 Stimuli									
30 ms / 166 Stimuli									
20 ms / 250 Stimuli									
10 ms / 500 Stimuli									
wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert									

Ventrikuläres Stimulationsprotokoll									
VRP									
8 ventrikuläre Stimuli S1:		S1S1 120 ms		S1S1 110 ms		S1S1 100 ms			
plus: S2 -10 ms von CL, reduzieren um 10ms bis VRP, dann auf 2ms genau		Start VRP		Start VRP		Start VRP			
Pacing 1/2									
Cave! retrograde VA Leitung									
Programmierte Extrastimulation S2-S4 zum Auslösen von VT									
8 ventrikuläre Stimuli S1		S1S1 120 ms		S1S1 110 ms		S1S1 100 ms			
a) S2 VRP+20 ms, S3 - 2 ms von SCL bis VRP		S2: S3:		S2: S3:		S2: S3:			
		Event: 0		Event: 0		Event: 0			
b) S2 VRP+20 ms, S3 VRP+20 ms, S4 - 2 ms von SCL bis VRP		S2: S3: S4:		S2: S3: S4:		S2: S3: S4:			
		Event: 0		Event: 0		Event: 0			
Ventrikuläre Burst Stimulation zum Auslösen von VT									
5 s Dauer	2x Reizschwelle	4x Reizschwelle							
60 ms / 100 Stimuli									
40 ms / 125 Stimuli									
30 ms / 166 Stimuli									
20 ms / 250 Stimuli									
10 ms / 500 Stimuli									
wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert									
Isoprenalin									
Atriale Burst Stimulation zum Auslösen von AF nach Isoprenalin									
5 s Dauer	2x Reizschwelle	4x Reizschwelle							Bemerkungen:
60 ms / 100 Stimuli									
40 ms / 125 Stimuli									
30 ms / 166 Stimuli									
20 ms / 250 Stimuli									
10 ms / 500 Stimuli									
wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert									
Ventrikuläre Burst Stimulation zum Auslösen von VT nach Isoprenalin									
5 s Dauer	2x Reizschwelle	4x Reizschwelle							Bemerkungen:
60 ms / 100 Stimuli									
40 ms / 125 Stimuli									
30 ms / 166 Stimuli									
20 ms / 250 Stimuli									
10 ms / 500 Stimuli									
wird Tachykardie ausgelöst, wird sie reproduziert									

Das von unserer Arbeitsgruppe eigens angefertigte Stimulationsprotokoll.

Bereits veröffentlicht in der Dissertation von Lukas Clasen, 2014.

AB= atriale Burststimulation, **S1S1=** Zykluslänge der ersten Stimuli, **S2=** erster Extrastimulus, **S3=** zweiter Extrastimulus, **S4=** dritter Extrastimulus, **VB=** Ventrikuläre Burststimulation, **Pacing E=** Elektrodenpaar, welches den Stimulus abgibt, **Sensing E=** Elektrodenpaar, welches das Signal aufzeichnet

